

Nucleic acid binding oligomers having C-branches for therapy and diagnosis**Nukleinsaure-bindende Oligomere mit C-Verzweigung fur Therapie und Diagnostik****Oligomeres liant les acides nucleiques avec branchement en C et leur usage en therapie et diagnostic****Assignee:**

BAYER AG, (200140), , 51368 Leverkusen, (DE), (applicant designated states:
AT;BE;CH;DE;DK;ES;FR;GB;GR;IE;IT;LI;NL;SE)

Inventor:

Lobberding, Dr. Antonius, Am Rohm 105, D-42113 Wuppertal, (DE)
Mielke, Dr. Burkhard, Heisterbachstrasse 4, D-51375 Leverkusen, (DE)
Schwemler, Dr. Christoph, Am Kloster 59, D-42799 Leichlingen, (DE)
Schwenner, Dr. Eckhard, Paul-Ehrlich-Strasse 29, D-42113 Wuppertal, (DE)
Stropp, Dr. Udo, Breidenhofer Strasse 12, D-42781 Haan, (DE)
Springer, Dr. Wolfgang, Katernberger Schulweg 31, D-42113 Wuppertal, (DE)
Kretschmer, Dr. Axel, Richard-Zorner-Strasse 32, D-51429 Bergisch Gladbach, (DE)
Potter, Dr. Thorsten, Roggendorfstrasse 63, D-51061 Koln, (DE)

Patent

Country Code/Number	Kind	Date
EP 646596	A1	April 05, 1995 (Basic)
EP 646596	B1	May 26, 1999

Application

Country Code/Number	Date
EP 94113573	August 31, 1994

Priority Application Number (Country Code, Number, Date): DE 4331011 (930913)**Designated States:** AT; BE; CH; DE; DK; ES; FR; GB; GR; IE; IT; LI; NL; SE**International Patent Class:** C07K-005/00; A61K-038/10**Abstract:** EP 646596 A1 (Translated)

The invention relates to nucleic acid-binding oligomers with C branching of the general formula (I) and to the corresponding monomers, whose radicals have the meaning stated in the description, to the use thereof as pharmaceuticals or as diagnostic aids.

THIS PAGE BLANK (USPTO)



(19) Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



(11) Veröffentlichungsnummer: **0 646 596 A1**

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(21) Anmeldenummer: 94113573.3

(51) Int. Cl.⁶: **C07K 5/00, A61K 38/10**

(22) Anmeldetag: 31.08.94

(30) Priorität: 13.09.93 DE 4331011

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:
05.04.95 Patentblatt 95/14

(64) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LI NL SE

(71) Anmelder: **BAYER AG**

D-51368 Leverkusen (DE)

(72) Erfinder: **Löbberding, Dr. Antonius**
Am Rohm 105

D-42113 Wuppertal (DE)
Erfinder: **Mielke, Dr. Burkhard**
Heisterbachstrasse 4
D-51375 Leverkusen (DE)
Erfinder: **Schuemler, Dr. Christoph**

Am Kloster 59

D-42799 Leichlingen (DE)

Erfinder: **Schwenner, Dr. Eckhard**

Paul-Ehrlich-Strasse 29

D-42113 Wuppertal (DE)

Erfinder: **Stropp, Dr. Udo**

Breidenhofer Strasse 12

D-42781 Haan (DE)

Erfinder: **Springer, Dr. Wolfgang**

Katernberger Schulweg 31

D-42113 Wuppertal (DE)

Erfinder: **Kretschmer, Dr. Axel**

Richard-Zörner-Strasse 32

D-51429 Bergisch Gladbach (DE)

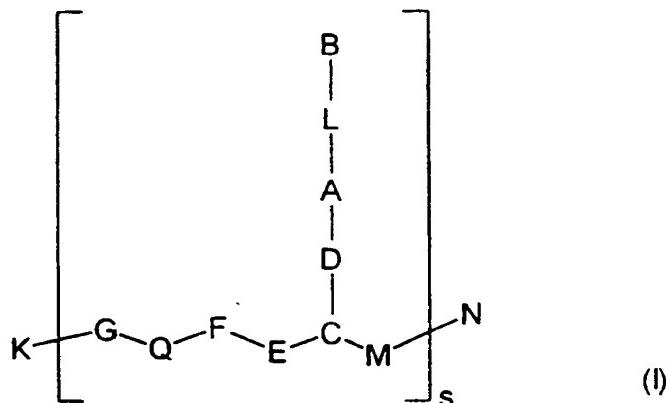
Erfinder: **Pötter, Dr. Thorsten**

Roggendorfstrasse 63

D-51061 Köln (DE)

(54) **Nukleinsäure-bindende Oligomere mit C-Verzweigung für Therapie und Diagnostik.**

(57) Die Erfindung betrifft Nukleinsäure-bindende Oligomere mit C-Verzweigung der allgemeinen Formel (I)



EP 0 646 596 A1

sowie die entsprechenden Monomere, deren Reste die in der Beschreibung angegebene Bedeutung haben,
deren Verwendung als Arzneimittel oder als Hilfsmittel in der Diagnostik.

Das gezielte Abschalten von Genexpression durch komplementäre Nukleinsäuren, sogenannte Antisense-Oligonukleotide, stellt einen neuen Therapieansatz dar. Mögliche Anwendungen reichen von der Behandlung viraler Infektionen bis zur Therapie von Krebs (S. Agrawal, Tibtech 10, 152 (1992); W. James, Antiviral Chemistry & Chemotherapy 2, 191 (1991); B. Calabretta, Cancer Research 51, 4505 (1991)). Die Kontrolle der Genexpression erfolgt auf der Ebene von DNA und RNA und gelingt bereits mit unmodifizierten Oligonukleotiden (C. Helene, Anti-Cancer Drug Design 6, 569 (1991); E. Uhlmann, A. Peyman, Chemical Reviews 90, 543 (1990)). Diese sind jedoch aufgrund mangelnder enzymatischer Stabilität und zu geringer Aufnahme in zelluläre Systeme für therapeutische Anwendungen nicht geeignet. Therapeutische Anwendungen erfordern chemisch modifizierte Antisense-Oligonukleotide.

Oligonukleotide mit modifiziertem Internukleotidphosphat oder einer phosphatfreien Internukleotidverknüpfung wurden in vielen Arbeiten systematisch untersucht; ihre Synthese erwies sich jedoch als sehr aufwendig und beobachtete therapeutische Effekte als nicht ausreichend (E. Uhlmann, A. Peyman, Chemical Reviews 90, 543 (1990)).

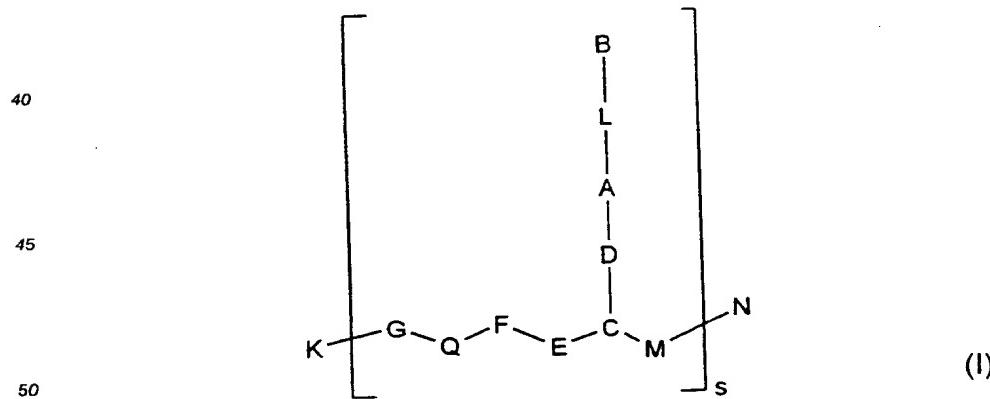
Eine Alternative zur Modifikation oder Substitution der Phosphatgruppe in Nukleinsäuren ist der komplekte Austausch von Ribose und Phosphat durch ein anderes Rückgrat. Dieses Konzept wurde erstmals von Pitha et al. realisiert, der Ribosephosphat durch Poly-N-Vinyl-Derivate ersetzte, was zu sogenannter "Plastik-DNA" führt (J. Pitha, P.O.P. Ts' O, J. Org. Chem. 33, 1341 (1968); J. Pitha, . Adv. Polym. Sci. 50, 1 (1983)). Es erlaubt jedoch nicht den gezielten Aufbau definierter Sequenzen.

Die Synthese definierter Sequenzen gelingt, wenn anstelle von Zuckerphosphat beispielsweise ein Polyamid-Rückgrat verwendet wird, das in Analogie zur konventionellen Peptidsynthese (M. Bodanszky, Principles of Peptide Synthesis, Springer, Berlin, 1984) schrittweise aufgebaut wird. Dieses Konzept wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen bearbeitet (B.V. Tyaglov, V.I. Permogorov, N.A. Chernykh, Yu. A. Semiletov, K. Konde, Yu.P. Shvachkin, Zh. Obshch. Khim. 57, 1393 (1987); J.E. Summerton et al. WO 86 05518 R.S. Varma et al. WO 92/18518; O. Buchardt et al. WO 92/20702; H. Wang, D.D. Weller, Tetrahedron Letters 32, 7385 (1991); P. Garner, J.U. Yoo, Tetrahedron Letters 34, 1275 (1993); S.-B. Huang, J.S. Nelson, D.D. Weller, J. Org. Chem. 56, 6007 (1991); H. De Koning, U.K. Pandit, Rec. Trav. Chim. 91 1069 (1971). A.B. Cheikh, L.E. Orgel, J. Mol. Evol., 30, 315 (1990)).

Polyamid-Nukleinsäuren eignen sich ebenfalls für diagnostische und molekularbiologische Anwendungen (Buchardt et al. WO 92/20703).

Wir haben neue Nukleinsäuren-bindende Oligomere mit einer C-Verzweigung synthetisiert und für diese wurde eine überraschend gute Bindung an DNA und RNA gefunden. Die Substanzen eignen sich zur Kontrolle von Genexpression und zeigen antivirale Eigenschaften. Weiterhin lassen sich derartige Substanzen in Diagnostik und Molekularbiologie zur Isolierung, Identifizierung und Quantifizierung von Nukleinsäuren verwenden.

Die Erfindung betrifft Verbindungen der allgemeinen Formel (I)



in der

55 A für -CO-, -CHR-, -CRR'- steht,
 B unabhängig voneinander ausgewählt wird aus einer Gruppe, bestehend aus: -H, -OH, (C_1 - C_4)-Alkanoyl, DNA-Interkalatoren, aromatischen Resten, heterocyclischen Resten, natürlich vorkommenden Nukleobasen wie Thymin, Uracil, Cytosin, Adenin, Guanin, Hypoxanthin, Inosin oder durch

chemische Modifikation von diesen abgeleitete Derivate sowie halogenierten Vorstufen dieser Nukleobasen, sowie geschützte Derivate der Nukleobasen mit den in der Nukleotid- oder Peptidchemie üblichen Schutzgruppen.

- C für -CH-, -CR- steht, wobei C einheitlich S oder R konfiguriert sein kann,
- D für -NH-, -CH₂-, -CHR-, -CRR'- steht,
- E für -NH-, -NR-, -CHR-, -CRR'-, -O-, -S- steht,
- A und E miteinander über eine Alkylkette [(-CH₂)_n, mit n = 0, 1, 2] verbunden sein können,
- F für -CH₂-, -CO-, -SO₂-, -SO-, -CS- steht,
- Q für (-CR'¹R²)_m mit m = 0, 1, 2 und R¹, R² unabhängig voneinander ausgewählt aus einer Gruppe bestehend aus Resten von natürlichen oder unnatürlichen Aminosäuren wie z.B. aus:
Glycin, Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Serin, Threonin, Cystein, Methionin, Phenylalanin, Tyrosin, Histidin, Tryptophan, Lysin, Ornithin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Asparagin, Glutamin, Arginin, Prolin, Hydroxyprolin, Sarcosin, Aminoisobuttersäure, Dehydroaminoäuren wie z.B. Dehydroalanin, Dehydro- α -aminobuttersäure, andere unnatürliche Aminosäuren wie Phenylglycin, 4-Nitrophenylalanin, 3-Nitrophenylalanin, 2-Nitrophenylalanin, 2-, 3- oder 4-Aminophenylalanin, 3,4-Dichlorphenylalanin, 4-Jodphenylalanin, 4-Methoxyphenylalanin, 1-Triazolylalanin, 2-Pyridylalanin, 3-Pyridylalanin, 4-Pyridylalanin, 1-Naphthylalanin oder 2-Naphthylalanin, gegebenenfalls mit Schutzgruppen, stereochemisch einheitlich in der L-Form oder der D-Form steht,
- G und Q miteinander über eine Alkylkette [(-CH₂)_n mit n = 0, 1, 2] verbunden sein können
- G für -NH-, -NR-, -O-, -S- steht,
- M für -CH₂-, -CO-, -SO₂-, -SO-, -CS- steht,
- L für (CH₂)_p mit p = 0, 1, 2, -CHR-, -CRR'- steht,
- K für Carrier-System, Reporter-Ligand, H, löslichkeitsvermittelnde Gruppe steht,
- N für Carrier-System, Reporter-Ligand, OH, löslichkeitsvermittelnde Gruppe steht und
- S für einen Wert von 1 bis 30 steht.

Allgemeine Definition der Reste R und R':

R und R' können unabhängig voneinander aus folgender Gruppe ausgewählt werden: H, OH, Alkyl (wobei Alkyl = Methyl, Ethyl, n-Propyl, iso-Propyl, n-Butyl, iso-Butyl oder tert.-Butyl sein kann), Aralkyl (wobei Aralkyl = Benzyl, α -Naphthylmethyl oder β -Naphthylmethyl sein kann) oder Aryl (wobei Aryl = Phenyl, 2-Pyridyl oder 4-Pyridyl gegebenenfalls substituiert mit Methyl, Halogen oder NO₂ sein kann).

Bevorzugt sind Verbindungen der allgemeinen Formel (I)

in der

- A für -CO-, -CHR-, -CRR'- steht,
- B unabhängig voneinander ausgewählt wird aus einer Gruppe, bestehend aus: -H, -OH, (C₁-C₄)-Alkanoyl, DNA-Interkalatoren, aromatischen Resten, heterocyclischen Resten, natürlich vorkommenden Nukleobasen wie Thymin, Uracil, Cytosin, Adenin, Guanin, Hypoxanthin, Inosin sowie halogenierten Vorstufen dieser Nukleobasen, sowie geschützte Derivate der Nukleobasen mit den in der Nukleotid- oder Peptidchemie üblichen Schutzgruppen,
- C für -CH-, -CR- steht, wobei C einheitlich S oder R konfiguriert sein kann,
- D für -NH-, -CH₂-, -CHR-, -CRR'- steht,
- E für -NR-, -NH-, -CHR-, CRR'-, -O- steht,
- A und E miteinander über eine Alkylkette [(-CH₂)_n, mit n = 0, 1, 2] verbunden sein können,
- F für -CH₂-, -CO-, -SO₂-, -SO-, -CS- steht,
- Q für (-CR'¹R²)_m mit m = 0, 1, 2 und R¹, R² unabhängig voneinander ausgewählt aus einer Gruppe bestehend aus Resten von natürlichen oder unnatürlichen Aminosäuren wie z.B. aus:
Glycin, Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Serin, Threonin, Cystein, Methionin, Phenylalanin, Tyrosin, Histidin, Tryptophan, Lysin, Ornithin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Asparagin, Glutamin, Arginin, Prolin, Hydroxyprolin, Sarcosin, Aminoisobuttersäure, Dehydroaminoäuren wie z.B. Dehydroalanin, Dehydro- α -aminobuttersäure, andere unnatürliche Aminosäuren wie Phenylglycin, 4-Nitrophenylalanin, 3-Nitrophenylalanin, 2-Nitrophenylalanin, 1-Naphthylalanin oder 2-Naphthylalanin, gegebenenfalls mit Schutzgruppen, stereochemisch einheitlich in der L-Form oder der D-Form steht,
- G und Q miteinander über eine Alkylkette [(-CH₂)_n mit n = 0, 1, 2] verbunden sein können
- G für -NH-, -NR-, -O- steht,
- M für -CH₂-, -CO-, -SO₂-, -CS- steht,
- L für (CH₂)_p mit p = 0, 1, 2, -CHR-, -CRR'- steht,
- K für Carrier-System, Reporter-Ligand, H, löslichkeitsvermittelnde Gruppe steht,
- N für Carrier-System, Reporter-Ligand, OH, löslichkeitsvermittelnde Gruppe steht,
- S für einen Wert von 1 bis 30 steht,

Allgemeine Definition der Reste R und R':

R und R' können unabhängig voneinander aus folgender Gruppe ausgewählt werden: H, OH, Alkyl (wobei Alkyl = Methyl, Ethyl, n-Propyl oder n-Butyl, sein kann) Benzyl oder Aryl (wobei Aryl = Phenyl, gegebenenfalls substituiert mit Methyl, Halogen oder NO₂ sein kann).

Besonders bevorzugt sind Verbindungen der allgemeinen Formel (I)

- 5 in der
- A für -CO-, -CHR-, -CRR'- steht,
 - B unabhängig voneinander ausgewählt wird aus einer Gruppe, bestehend aus: -H, -OH, (C₁-C₄)-Alkanoyl, DNA-Interkalatoren, aromatischen Resten, heterocyclischen Resten, natürlich vorkommenden Nukleobasen wie Thymin, Uracil, Cytosin, Adenin, Guanin, Hypoxanthin, Inosin sowie halogenierten Vorstufen dieser Nukleobasen, sowie geschützte Derivate der Nukleobasen mit den Schutzgruppen,
 - C in der Nukleotid- oder Peptidchemie üblichen Schutzgruppen,
 - D für -NH-, -CH₂-, -CHR-, -CRR'- steht,
 - E für -NR-, -NH-, -CHR- steht,
- 10 A und E miteinander über eine Alkylkette [-(CH₂)_n-, mit n = 0, 1, 2] verbunden sein können,
- F für -CH₂-, -CO-, -CS- steht,
 - Q für (-CR¹R²)_m mit m = 0, 1, 2 und R¹, R² unabhängig voneinander ausgewählt aus einer Gruppe bestehend aus Resten von natürlichen oder unnatürlichen Aminosäuren wie z.B. aus:
- 15 Glycin, Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Serin, Threonin, Cystein, Methionin, Phenylalanin, Thyrosin, Histidin, Tryptophan, Lysin, Ornithin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Asparagin, Glutamin, Arginin, Dehydroalanin, Dehydroprolin, Sarcosin, Aminoisobuttersäure, Dehydroaminoacidsäuren wie z.B. Dehydroalanin, Dehydro- α -aminobuttersäure, andere unnatürliche Aminosäuren wie Phenylglycin, gegebenenfalls mit Schutzgruppen, stereochemisch einheitlich in der L-Form oder der D-Form steht,
- 20 G und Q miteinander über eine Alkylkette [(-CH₂)_n mit n = 0, 1, 2] verbunden sein können
- G für -NH-, -NR-, -O- steht,
 - M für -CH₂-, -CO-, -CS- steht,
 - L für (CH₂)_p mit p = 0, 1, 2, -CHR-, -CRR'- steht,
 - K für Carrier-System, Reporter-Ligand, H, löslichkeitsvermittelnde Gruppe steht,
 - N für Carrier-System, Reporter-Ligand, OH, löslichkeitsvermittelnde Gruppe steht,
 - S für einen Wert von 1 bis 30 steht,
- 25 Allgemeine Definition der Reste R und R':
- R und R' können unabhängig voneinander aus folgender Gruppe ausgewählt werden: H, OH, Methyl oder Benzyl.

35 Monomere- und Dipeptid-Bausteine für Peptid-Nukleinsäuren

Die Erfindung betrifft weiterhin Verbindungen der allgemeinen Formel (II)

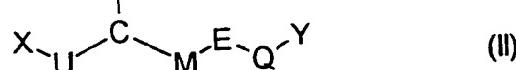
40

B
|
L

45

A
|
D

50



in der

- 55 A für -CO-, -CHR-, -CRR'- steht,
- B unabhängig voneinander gewählt wird aus einer Gruppe, bestehend aus: -H, -OH, (C₁-C₄)-Alkanoyl, DNA-Interkalatoren, aromatischen Resten, heterocyclischen Resten, natürlich vorkommenden Nukleobasen wie Thymin, Uracil, Cytosin, Adenin, Guanin, Hypoxanthin, Inosin oder durch chemische

Modifikation von diesen abgeleiteten Derivaten, sowie halogenierten Vorstufen dieser Nukleobasen, sowie geschützte Derivate dieser Nukleobasen mit den in der Nukleotid- oder Peptidchemie üblichen Schutzgruppen.

- C für -CH-, -CR- steht, wobei C einheitlich S oder R konfiguriert sein kann,
- D für -NH-, -CH₂-, -CHR-, -CRR'- steht,
- E für -NH-, -NR-, CHR-, -CRR'-, -O-, -S- steht,
- Q für (-CR¹R²-)_m mit m = 0, 1, 2 und R¹, R² unabhängig voneinander ausgewählt aus einer Gruppe bestehend aus Resten von natürlichen oder unnatürlichen Aminosäuren wie z.B. aus: Glycin, Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Serin, Threonin, Cystein, Methionin, Phenylalanin, Tyrosin, Histidin, Tryptophan, Lysin, Ornithin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Asparagin, Glutamin, Arginin, Prolin, Hydroxyprolin, Sarcosin, Aminoisobuttersäure, Dehydroaminosäuren wie z.B. Dehydroalanin, Dehydro- α -aminobuttersäure, andere unnatürliche Aminosäuren wie Phenylglycin, 4-Nitrophenylalanin, 3-Nitrophenylalanin, 2-Nitrophenylalanin, 2-, 3- oder 4-Aminophenylalanin, 3,4-Dichlorphenylalanin, 4-Jodphenylalanin, 4-Methoxyphenylalanin, 1-Triazolylalanin, 2-Pyridylalanin, 3-Pyridylalanin, 4-Pyridylalanin, 1-Naphthylalanin oder 2-Naphthylalanin, gegebenenfalls mit Schutzgruppen, stereochemisch einheitlich in der L-Form oder der D-Form steht,

E und Q miteinander über eine Alkylkette [(-CH₂)_n mit n = 0, 1, 2] verbunden sein können

- M für -CH₂-, -CO-, -SO₂-, -SO-, -CS- steht,
- L für (CH₂)_p mit p = 0, 1, 2, -CHR-, -CRR'- steht,
- U für -NH-, -NR-,
- X für eine beliebige aus der Peptidchemie bekannte Schutzgruppe, H oder eine beliebige natürliche oder unnatürliche Aminosäure in geschützter oder ungeschützter Form und
- Y für COOH, CSOH, CH₂OH, COOR" mit R" = beliebige Schutzgruppe aus der Peptidchemie, Carrier, Reporter-Ligand, löslichkeitsvermittelnde Gruppe steht.

25 Allgemeine Definition der Reste R und R':

R und R' können unabhängig voneinander aus folgender Gruppe ausgewählt werden: H, OH, Alkyl (wobei Alkyl = Methyl, Ethyl, n-Propyl, iso-Propyl, n-Butyl, iso-Butyl oder tert.-Butyl sein kann), Aralkyl (wobei Aralkyl = Benzyl, α -Naphthylmethyl oder β -Naphthylmethyl sein kann) oder Aryl (wobei Aryl = Phenyl, 2-Pyridyl oder 4-Pyridyl gegebenenfalls substituiert mit Methyl, Halogen oder NO₂ sein kann).

30 Bevorzugt sind Verbindungen der allgemeinen Formel (II)

in der

- A für -CO-, -CHR-, -CRR'- steht,
- B unabhängig voneinander gewählt wird aus einer Gruppe, bestehend aus: -H, -OH, (C₁-C₄)-Alkanoyl, DNA-Interkalatoren, aromatischen Resten, heterocyclischen Resten, natürlich vorkommenden Nukleobasen wie Thymin, Uracil, Cytosin, Adenin, Guanin, Hypoxanthin, Inosin sowie halogenierten Vorstufen dieser Nukleobasen, sowie geschützte Derivate dieser Nukleobasen mit den in der Nukleotid- oder Peptidchemie üblichen Schutzgruppen,

- C für -CH-, -CR- steht, wobei C einheitlich S oder R konfiguriert sein kann,
- D für -NH-, -CH₂-, -CHR-, -CRR'- steht,
- E für -NR-, -NH-, -CHR-, -CRR'-, -O- steht,
- Q für (-CR¹R²-)_m mit m = 0, 1, 2 und R¹, R² unabhängig voneinander ausgewählt aus einer Gruppe bestehend aus Resten von natürlichen oder unnatürlichen Aminosäuren wie z.B. aus: Glycin, Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Serin, Threonin, Cystein, Methionin, Phenylalanin, Thyrosin, Histidin, Tryptophan, Lysin, Ornithin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Asparagin, Glutamin, Arginin, Prolin, Hydroxyprolin, Sarcosin, Aminoisobuttersäure, Dehydroaminosäuren wie z.B. Dehydroalanin, Dehydro- α -aminobuttersäure, andere unnatürliche Aminosäuren wie Phenylglycin, 4-Nitrophenylalanin, 3-Nitrophenylalanin, 2-Nitrophenylalanin, 1-Naphthylalanin oder 2-Naphthylalanin, gegebenenfalls mit Schutzgruppen, stereochemisch einheitlich in der L-Form oder der D-Form steht,

E und Q miteinander über eine Alkylkette [(-CH₂)_n mit n = 0, 1, 2] verbunden sein können

- M für -CH₂-, -CO-, -SO₂-, -SO-, -CS- steht,
- L für (CH₂)_p mit p = 0, 1, 2, -CHR-, -CRR'- steht,
- U für -NH-, -NR-,
- X für eine beliebige aus der Peptidchemie bekannte Schutzgruppe, H oder eine beliebige natürliche oder unnatürliche Aminosäure in geschützter oder ungeschützter Form und
- Y für COOH, CSOH, CH₂OH, COOR" mit R" = beliebige Schutzgruppe aus der Peptidchemie, Carrier, Reporter-Ligand, löslichkeitsvermittelnde Gruppe steht.

Allgemeine Definition der Reste R und R':

R und R' können unabhängig voneinander aus folgender Gruppe ausgewählt werden: H, OH, Alkyl (wobei

EP 0 645 596 A1

Alkyl = Methyl, Ethyl, n-Propyl oder n-Butyl, sein kann), Benzyl oder Aryl (wobei Aryl = Phenyl, gegebenenfalls substituiert mit Methyl, Halogen oder NO₂ sein kann).

Besonders bevorzugt sind Verbindungen der allgemeinen Formel (II)

in der

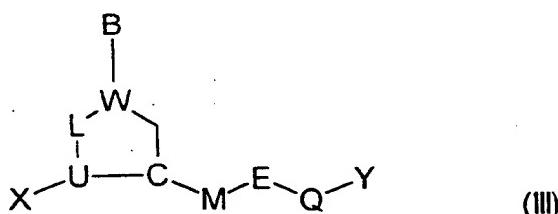
- 5 A für -CO-, -CHR-, -CRR'- steht,
 B unabhängig voneinander gewählt wird aus einer Gruppe, bestehend aus: -H, -OH, (C₁-C₄)-Alkanoyl, DNA-Interkalatoren, aromatischen Resten, heterocyclischen Resten, natürlich vorkommenden Nukleobasen wie Thymin, Uracil, Cytosin, Adenin, Guanin, Hypoxanthin, Inosin sowie halogenierten Vorstufen dieser Nukleobasen sowie geschützte Derivate dieser Nukleobasen mit den in der 10 Nukleotid- oder Peptidchemie üblichen Schutzgruppen,
 C für -CH-, -CR- steht, wobei C einheitlich S oder R konfiguriert sein kann,
 D für -NH-, -CH₂-, -CHR-, -CRR'- steht,
 E für -NR-, -NH-, -CHR-, -O- steht,
 Q für (-CR¹R²)_m mit m = 0, 1, 2 und R¹, R² unabhängig voneinander ausgewählt aus einer Gruppe 15 bestehend aus Resten von natürlichen oder unnatürlichen Aminosäuren wie z.B. aus: Glycin, Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Serin, Threonin, Cystein, Methionin, Phenylalanin, Thyrosin, Histidin, Tryptophan, Lysin, Ornithin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Asparagin, Glutamin, Arginin, Prolin, Hydroxyprolin, Sarcosin, Aminoisobuttersäure, Dehydroaminoäsuren wie z.B. Dehydroalanin, Dehydroalanin, Hydro- α -aminobuttersäure, andere unnatürliche Aminosäuren wie Phenylglycin, gegebenenfalls mit Schutzgruppen, stereochemisch einheitlich in der L-Form oder der D-Form steht,
 E und Q miteinander über eine Alkylkette [(-CH₂)_n mit n = 0, 1, 2] verbunden sein können
 M für -CH₂-, -CO-, -CS- steht.
 L für (CH₂)_p mit p = 0, 1, 2, -CHR-, -CRR'- steht,
 U für -NH-, -NR-,
 X für eine beliebige aus der Peptidchemie bekannte Schutzgruppe, H oder eine beliebige natürliche 25 oder unnatürliche Aminosäure in geschützter oder ungeschützter Form und
 Y für COOH, CSOH, CH₂OH, COOR" mit R" = beliebige Schutzgruppe aus der Peptidchemie, Carrier, Reporter-Ligand, löslichkeitsvermittelnde Gruppe steht.

Allgemeine Definition der Reste R und R':

- 30 R und R' können unabhängig voneinander aus folgender Gruppe ausgewählt werden: H, OH, Methyl oder Benzyl.

Die Erfindung betrifft auch Verbindungen der allgemeinen Formel (III)

35



45 in der

- A für -CO-, -CHR-, -CRR'- steht,
 B unabhängig voneinander gewählt wird aus einer Gruppe, bestehend aus: -H, -OH, (C₁-C₄)-Alkanoyl, DNA-Interkalatoren, aromatischen Resten, heterocyclischen Resten, natürlich vorkommenden Nukleobasen wie Thymin, Uracil, Cytosin, Adenin, Guanin, Hypoxanthin, Inosin oder durch chemische 50 Modifikation von diesen abgeleiteten Derivaten, sowie halogenierten Vorstufen dieser Nukleobasen sowie geschützte Derivate dieser Nukleobasen mit den in der Nukleotid- oder Peptidchemie üblichen Schutzgruppen,
 C für -CH-, -CR- steht, wobei C einheitlich S oder R konfiguriert sein kann,
 D für -NH-, -CH₂-, -CHR-, -CRR'- steht,
 E für -NR-, -CHR-, -CRR'-, -O-, -S- steht,
 Q für (-CR¹R²)_m mit m = 0, 1, 2 und R¹, R² unabhängig voneinander ausgewählt aus einer Gruppe 55 bestehend aus Resten von natürlichen oder unnatürlichen Aminosäuren wie z.B. aus: Glycin, Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Serin, Threonin, Cystein, Methionin, Phenylalanin, Thyrosin, Histidin

5 din, Tryptophan, Lysin, Ornithin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Asparagin, Glutamin, Arginin, Prolin, Hydroxyprolin, Sarcosin, Aminoisobuttersäure, Dehydroaminosäuren wie z.B. Dehydroalanin, Dehydro- α -aminobuttersäure, andere unnatürliche Aminosäuren wie Phenylglycin, 4-Nitrophenylalanin, 3-Nitrophenylalanin, 2-Nitrophenylalanin, 2-, 3- oder 4-Aminophenylalanin, 3,4-Dichlorphenylalanin, 4-Jodphenylalanin, 4-Methoxyphenylalanin, 1-Triazolylalanin, 2-Pyridylalanin, 3-Pyridylalanin, 4-Pyridylalanin, 1-Naphthylalanin oder 2-Naphthylalanin, gegebenenfalls mit Schutzgruppen, stereochemisch einheitlich in der L-Form oder der D-Form steht,

E und Q miteinander über eine Alkylkette [(-CH₂)_n mit n = 0, 1, 2] verbunden sein können

M für -CH₂-, -CO-, -SO₂-, -SO-, -CS- steht,

10 U für -NH-, -NR- steht,

X für eine beliebige aus der Peptidchemie bekannte Schutzgruppe, H oder eine beliebige natürliche oder unnatürliche Aminosäure in geschützter oder ungeschützter Form steht,

Y für COOH, CSOH, CH₂OH, COOR" mit R" = beliebige Schutzgruppe aus der Peptidchemie, Carrier, Reporter-Ligand, löslichkeitsvermittelnde Gruppe steht,

15 W für ein chirales C-Atom steht, welches einheitlich S oder R konfiguriert sein kann.

Allgemeine Definition der Reste R und R':

R und R' können unabhängig voneinander aus folgender Gruppe ausgewählt werden: H, OH, Alkyl (wobei Alkyl = Methyl, Ethyl, n-Propyl, iso-Propyl, n-Butyl, iso-Butyl oder tert-Butyl sein kann), Aralkyl (wobei Aralkyl = Benzyl, α -Naphthylmethyl oder β -Naphthylmethyl sein kann) oder Aryl (wobei Aryl = Phenyl, 2-Pyridyl oder 4-Pyridyl gegebenenfalls substituiert mit Methyl, Halogen oder NO₂ sein kann).

Bevorzugt sind Verbindungen der allgemeinen Formel (III)

in der

A für -CO-, -CHR-, -CRR'- steht,

25 B unabhängig voneinander gewählt wird aus einer Gruppe, bestehend aus: -H, -OH, (C₁-C₄)-Alkanoyl, DNA-Interkalatoren, aromatischen Resten, heterocyclischen Resten natürlich vorkommenden Nukleobasen wie Thymin, Uracil, Cytosin, Adenin, Guanin, Hypoxanthin, Inosin sowie halogenierten Vorstufen dieser Nukleobasen, sowie geschützte Derivate dieser Nukleobasen mit den in der Nukleotid- oder Peptidchemie üblichen Schutzgruppen,

C für -CH-, -CR- steht, wobei C einheitlich S oder R konfiguriert sein kann,

30 D für -NH-, -CH₂-, -CHR-, -CRR'- steht,

E für -NR-, -NH-, -CHR-, -CRR'-, -O- steht,

Q für (-CR¹R²)_m mit m = 0, 1, 2 und R¹, R² unabhängig voneinander ausgewählt aus einer Gruppe bestehend aus Resten von natürlichen oder unnatürlichen Aminosäuren wie z.B. aus: Glycin, Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Serin, Threonin, Cystein, Methionin, Phenylalanin, Thyrosin, Histidin, Tryptophan, Lysin, Ornithin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Asparagin, Glutamin, Arginin, Prolin, Hydroxyprolin, Sarcosin, Aminoisobuttersäure, Dehydroaminosäuren wie z.B. Dehydroalanin, Dehydro- α -aminobuttersäure, andere unnatürliche Aminosäuren wie Phenylglycin, 4-Nitrophenylalanin, 3-Nitrophenylalanin, 2-Nitrophenylalanin, 1-Naphthylalanin oder 2-Naphthylalanin, gegebenenfalls mit Schutzgruppen, stereochemisch einheitlich in der L-Form oder der D-Form steht,

40 E und Q miteinander über eine Alkylkette [(-CH₂)_n mit n = 0, 1, 2] verbunden sein können

M für -CH₂-, -CO-, -SO₂-, -SO-, -CS- steht,

U für -NH-, -NR-,

X für eine beliebige aus der Peptidchemie bekannte Schutzgruppe, H oder eine beliebige natürliche oder unnatürliche Aminosäure in geschützter oder ungeschützter Form steht,

45 Y für COOH, CSOH, CH₂OH, COOR" mit R" = beliebige Schutzgruppe aus der Peptidchemie, Carrier, Reporter-Ligand, löslichkeitsvermittelnde Gruppe steht,

W für ein chirales C-Atom steht, welches einheitlich S oder R konfiguriert sein kann.

Allgemeine Definition der Reste R und R':

R und R' können unabhängig voneinander aus folgender Gruppe ausgewählt werden: H, OH, Alkyl (wobei Alkyl = Methyl, Ethyl, n-Propyl oder n-Butyl, sein kann), Benzyl oder Aryl (wobei Aryl = Phenyl, gegebenenfalls substituiert mit Methyl, Halogen oder NO₂ sein kann).

Besonders bevorzugt sind Verbindungen der allgemeinen Formel (III)

in der

A für -CO-, -CHR-, -CRR'- steht,

55 B unabhängig voneinander gewählt wird aus einer Gruppe, bestehend aus: -H, -OH, (C₁-C₄)-Alkanoyl, DNA-Interkalatoren, aromatischen Resten, heterocyclischen Resten, natürlich vorkommenden Nukleobasen wie Thymin, Uracil, Cytosin, Adenin, Guanin, Hypoxanthin, Inosin sowie halogenierten Vorstufen dieser Nukleobasen sowie geschützte Derivate dieser Nukleobasen mit den in der

- Nukleotid- oder Peptidchemie üblichen Schutzgruppen,
- C für -CH-, -CR- steht, wobei C einheitlich S oder R konfiguriert sein kann,
- D für -NH-, -CH₂-, -CHR-, -CRR'- steht,
- E für -NR-, -NH-, -CHR-, -O- steht,
- 5 Q für (-CR¹R²)_m mit m = 0, 1, 2 und R¹, R² unabhängig voneinander ausgewählt aus einer Gruppe bestehend aus Resten von natürlichen oder unnatürlichen Aminosäuren wie z.B. aus: Glycin, Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Serin, Threonin, Cystein, Methionin, Phenylalanin, Thyrosin, Histidin, Tryptophan, Lysin Ornithin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Asparagin, Glutamin, Arginin, Prolin, Hydroxyprolin, Sarcosin, Aminoisobuttersäure, Dehydroaminoäuren wie z.B. Dehydroalanin, Dehydro- α -aminobuttersäure, andere unnatürliche Aminosäuren wie Phenylglycin, gegebenenfalls mit Schutzgruppen, stereochemisch einheitlich in der L-Form oder der D-Form steht,
- 10 E und Q miteinander über eine Alkylkette [(-CH₂)_n mit n = 0, 1, 2] verbunden sein können
- M für -CH₂-, -CO-, -CS- steht,
- U für -NH-, -NR-,
- 15 X für eine beliebige aus der Peptidchemie bekannte Schutzgruppe, H oder eine beliebige natürliche oder unnatürliche Aminosäure in geschützter oder ungeschützter Form steht,
- Y für COOH, CSOH, CH₂OH, COOR" mit R" = beliebige Schutzgruppe aus der Peptidchemie, Carrier, Reporter-Ligand, löslichkeitsvermittelnde Gruppe steht,
- W für ein chirales C-Atom steht, welches einheitlich S oder R konfiguriert sein kann.
- 20 Allgemeine Definition der Reste R und R':
- R und R' können unabhängig voneinander aus folgender Gruppe ausgewählt werden: H, OH, Methyl oder Benzyl.
- Mit Carrier-System oder Reporter-Ligand ist gemeint ein zellspezifisches Bindungs- und Erkennungs-Agens, das spezifisch an die Zelloberfläche bindet und das die Internalisierung der der Erfindung zugrunde liegenden Nukleinsäure-bindenden Oligomeren bewirkt. Die Internalisierung kann auf verschiedenem Wege, z.B. durch Endocytose oder aktive Transportmechanismen erfolgen.
- 25 Die Struktur der Zelloberfläche kann ein Protein, Polypeptid, Kohlenhydrat, Lipid oder eine Kombination daraus sein. Typischerweise wird die Zellaufnahme durch Oberflächenrezeptoren bewirkt. Deshalb kann das Bindungs- und Erkennungs-Agens ein natürlicher oder synthetischer Ligand eines Rezeptors sein.
- Der Ligand kann ein Protein, Polypeptid, Kohlenhydrat, Lipid oder eine Kombination von diesen sein, ausgestattet mit funktionellen Gruppen, die so angeordnet sind, daß sie durch die Zelloberflächen-Struktur erkannt werden können. Es kann sich auch um eine Komponente oder die Gesamtheit eines biologischen Organismus handeln, z.B. eines Virus, einer Zelle oder um artifizielle Transportsysteme, wie z.B. Liposomen. Es kann sich weiterhin um einen Antikörper oder ein Analogon eines Antikörpers handeln.
- 30 Für die Adressierung an unterschiedliche Zellen müssen verschiedene Liganden eingesetzt werden.
- Als Liganden für die Adressierung an Makrophagen kommen bevorzugt Kohlenhydrate, wie z.B. Mannose, Polykationen, wie z.B. Polylysine, Polyarginine, Polyornithine, basische Proteine, wie z.B. Avidin, sowie Glycopeptide, Peptide oder Lipopeptide in Frage (G.Y. Chu et al., WO 9304701).
- Mit löslichkeitsvermittelnden Gruppen sind funktionelle Gruppen gemeint, die die Löslichkeit in Wasser vermitteln. Dabei kann es sich z.B. um Ester oder Amide von Aminosäuren, Hydroxycarbonsäuren, 40 Aminosulfonsäuren, Hydroxysulfonsäuren oder Diaminen handeln. Bevorzugt sind Amide von Diaminocarbonsäure, wie Ornithin, Lysin oder 2,4-Diaminobuttersäure.

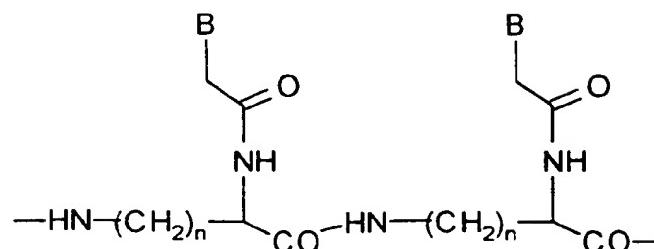
45

50

55

Peptid-Nukleinsäuren mit α,ω -Diaminocarbonsäure-Backbone

5

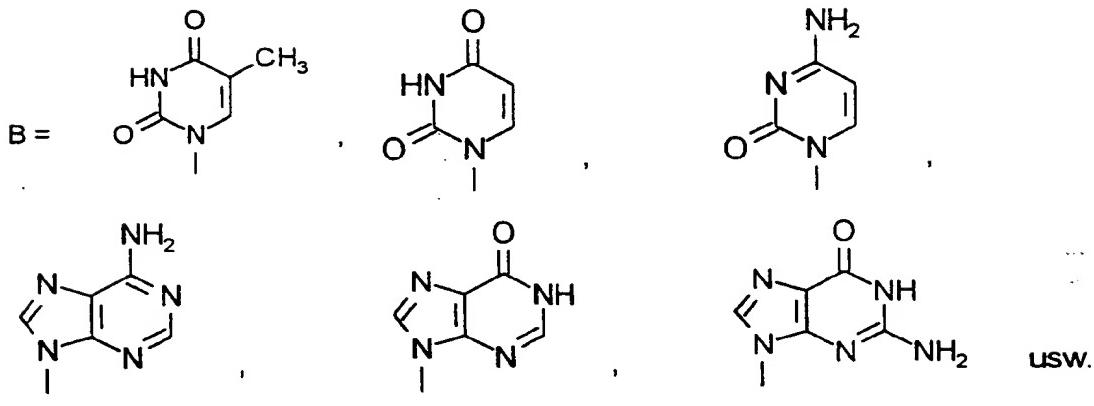


10

 $n = 2, 3$ oder 4

15

20



30

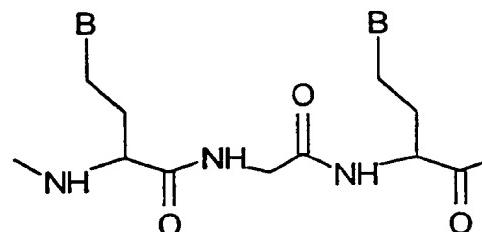
Bei den Verbindungen dieses Typs ist das Zuckerphosphat-Rückgrat der natürlichen Nukleinsäuren durch ein über die Seitenketten verknüpftes Polymeres aus α,ω -Diaminocarbonsäuren, wie z.B. Lysin, 35 Ornithin oder 2,4-Diaminobuttersäure ersetzt. Die Nukleobasen sind über Acyl-Spacer an die α -Aminogruppen gebunden. Es resultieren relativ flexible Oligomere.

Peptid-Nukleinsäuren mit 2-Aminobutyrylglycin-Backbone

40 Bei den Verbindungen dieses Typs ist das Ribosephosphat- bzw. Desoxyribosephosphat-Backbone von RNA bzw. DNA durch ein Peptidbackbone aus 2-Aminobutyrylglycin-Dipeptiden ersetzt. Das resultierende Oligomere zeichnet sich durch seine hohe Flexibilität aus. Durch den Kettenaufbau mit chiralen α -Aminosäuren wird zudem die Variationsbreite (Änderung der Chiralität, Verwendung anderer Späne anstelle von Glycin) bei der Oligomerensynthese enorm erhöht.

45

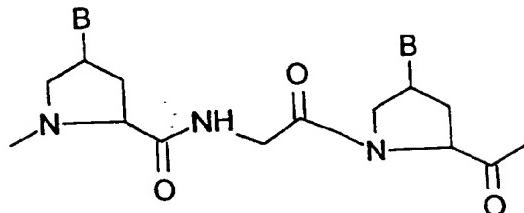
50



55

(B ist definiert wie oben)

Peptid-Nukleinsäuren mit Pyrrolidin-2-carboxyglycin-Backbone



(B ist definiert wie oben)

Bei diesem Strukturtyp ist das Zuckerphosphat-Backbone der natürlichen Nukleinsäuren durch ein Peptidbackbone aus Pyrrolidin-2-carboxylglycin-Dipeptiden ersetzt. Durch den Einsatz von Pyrrolidin-2-carbonsäure im Backbone erhält man rigide Strukturen. Durch Variation der Chiralitätszentren an der Pyrrolidin-2-carbonsäure erhält man Oligomere mit unterschiedlicher Konformation. Außerdem erlaubt auch dieser Ansatz das Ersetzen des Glycinspacer durch andere Spacer wie z.B. andere Aminosäuren oder Hydroxycarbonsäuren..

Biologische Eigenschaften bzw. Wirkungen dieser Verbindungen

Stabilität gegenüber Proteasen und Nukleasen

Neben der Kettenlänge, der Sequenz und der Zellpermeabilität spielt die Protease- und Nukleaseresistenz eine wichtige Rolle für die biologische Wirkung von Nukleinsäure-bindenden Oligomeren. Die synthetisierten Oligomeren wurden deshalb in Bezug auf ihre Protease- und Nukleastabilität mit 30 α -Chymotrypsin verglichen.

30 Die synthetischen natürlichen Oligonukleotiddiestern verglichen.
 Die Nukleinsäure bindenden Oligomere wurden hierzu mit unspezifischen und spezifischen Proteasen wie z.B. Pronase E, Proteinase K, Trypsin, Endoprotease Lys-C, V8 Protease, Protease IX, Protease XXI, und Nukleasen wie z.B. S1 Nuklease, Bal31 Nuklease, Phosphodiesterase sowie Zellextrakte, Organextrakte, Blutserum und Blutextrakte, die verschiedene Nukleasen und Proteasen enthalten, behandelt. Durch 35 Polyacrylamidgelektrophorese und UV-Shadowing auf DC-Platten mit UV-Indikator sowie durch Silberanfärbung der Polyacrylamidgele wurden die Oligomeren auf Degradation überprüft.
 Natürliche Oligonukleotid-Diester weisen eine nur geringe Nukleasestabilität auf. Sie werden innerhalb

40 von 30 Minuten bis zu 1 Stunde vollständig degradiert.
Nukleinsäuren-bindende Oligomere mit C-Verzweigung sind dagegen vollständig resistent gegenüber Nukleaseen und Proteasen und eignen sich deshalb besonders gut für den Einsatz als Inhibitoren mit Antisense Wirkung.

DNA-Einzelstrangbindung durch Gel-Shift-Analysen

45 Die hier beschriebenen Nukleinsäure-bindenden Oligomeren wurden in Gel-Shift-Analysen untersucht.
Bei diesen Band-Shift-Experimenten wurde das geänderte Laufverhalten von radioaktiv-markierten Oligonu-
kloiden nach Hybridisierung mit den hier beschriebenen Oligomeren in einer Polyacrylamidgelektropho-
rese gemessen. Die hybridisierten Oligonukleotide wandern in der Elektrophorese langsamer, weil sich
50 durch die Hybridebildung erstens das Molekulargewicht vergrößert und zweitens sich die Ladung pro
Masseeinheit im Hybridekomplex verringert. Im Vergleich zu einem nicht hybridisierten Oligonukleotid kommt
es im Gel zu einem verzögerten Laufverhalten (Gel-Retardation).

Strangverdrängung in doppelsträngiger Plasmid-DNA

55 Nukleinsäure-bindende Oligomere sind biologisch aktiv, indem sie sequenzselektiv die Bindung durch Strangverdrängung an doppelsträngige DNA (dsDNA) zeigen. Diese Wirkung von Nukleinsäure-bindenden Oligomeren lässt sich sequenzabhängig und konzentrationsabhängig in in-vitro Tests nachweisen.

Inhibition der Genexpression (In-vitro-Translationstest)

Nukleinsäure-bindende Oligomere, die in Gel-Shift- und Strangverdrängungs-Experimenten aufgefallen sind, wurden auf ihre Fähigkeit getestet, die Proteinsynthese spezifischer Gene zu inhibieren. Voraussetzung dafür ist, daß in dem betreffenden Gen die entsprechende Sequenz des Nukleinsäure-bindenden Oligomeren in paralleler oder antiparalleler Basensequenz enthalten ist. Es hatte sich bei den *in vitro* Translationen gezeigt, daß die hier beschriebenen Nukleinsäure-bindenden Oligomeren sehr potente, sequenzspezifische Inhibitoren für Genexpressionen sind. Dabei waren kürzere Sequenzen und geringere Konzentrationen als bei sequenzgleichen Oligonukleotiden ausreichend für bessere Hemmungen.

Die Zielsequenz kann aus dem Promotor eines krankheitsauslösenden Gens stammen. Insbesondere Enhancer- oder Transkriptionsfaktoren und DNA- oder RNA-Polymerase bindende Zielsequenzen aus Genen von Viren, Bakterien, Pilzen, Endoparasiten, Oncothen oder Genen, die an der Ausprägung von Entzündungserkrankungen, Autoimmunerkrankungen, oder Herzkreislauferkrankungen wie Bluthochdruck oder Arteriosklerose beteiligt sind, sind hier als mögliche Zielsequenzen für die therapeutische Anwendung von Nukleinsäuren-bindenden Oligomeren zu nennen.

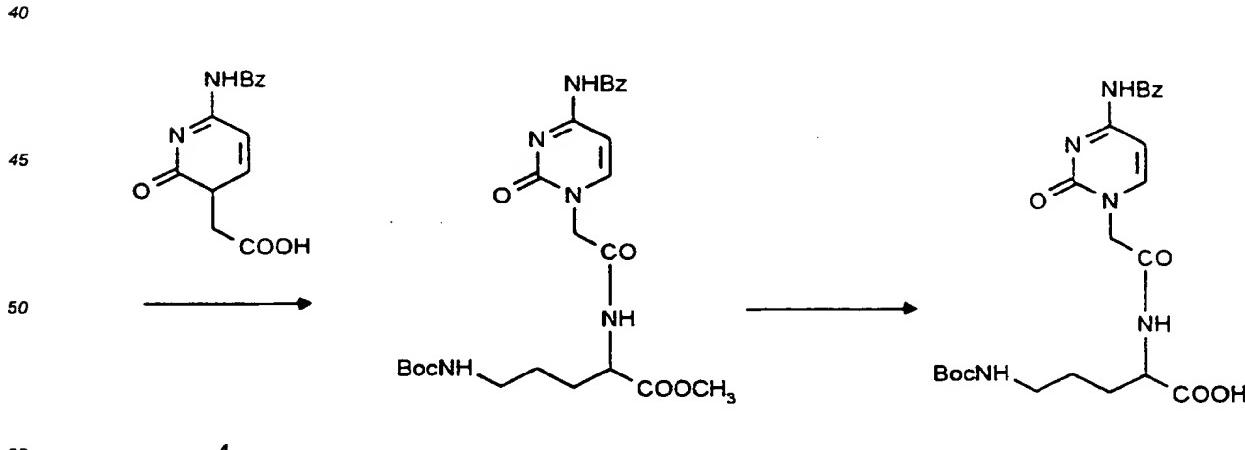
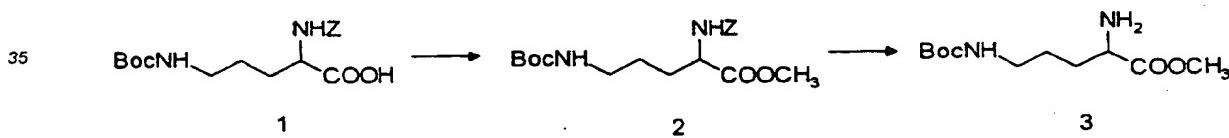
15 von Nukinsäuren enthaltenden Oligomeren zu kennen.
Die entsprechenden pharmazeutischen Zubereitungen enthalten neben Oligomeren mit C-Verzweigung
die für parenterale Zubereitungen üblichen Hilfsstoffe wie z.B. Puffer und/oder Stabilisatoren oder Liposo-
menformulierungen. Ferner ist eine topische Anwendung denkbar. Die hierfür einsetzbaren Zubereitungen
sind z.B. Salben, Cremes, Lösungen oder Pflaster, die neben dem Wirkstoff die für diese Anwendung
geeigneten pharmazeutischen Hilfsstoffe enthalten.

Therapeutisch wirksame Nukleinsäuren bindende Oligomere, wie sie hier beschrieben sind, können nicht nur wie oben erwähnt die Genexpression durch die sequenz-selektive Bindung an mRNA hemmen, sondern natürlich auch aufgrund ihrer Eigenschaft doppelsträngige DNA zu verdrängen, die Promotor- und Enhancersequenzen von zu hemmenden Genen sequenz-selektiv inaktivieren.

25 Nukleinsäuren-bindende Oligomere enthalten für diese Anwendung der Gen-Inaktivierung nicht nur Nukleotidsequenzen von (-)-Strang DNA sondern durchaus auch die (+)-Strang DNA Sequenz der zu hemmenden Ziel-DNA.

5. Synthese von monomeren Bausteinchen

5.1 Monomere für Peptid-Nukleinsäuren mit α,ω -Diaminocarbonsäure-Backbone



Die Synthese der Monomeren für Peptid-Nukleinsäuren mit α,ω -Diaminocarbonsäure-Backbone sei am Beispiel des Cytosin-Ornithin-Derivates 6 erläutert:
 5 α -N-(Benzoyloxycarbonyl)- δ -N-(tert.-butoxycarbonyl)-L-ornithin 1 wird mit Methyliodid und Cäsiumcarbonat in den Methylester 2 überführt. Die α -N-Benzoyloxycarbonyl-Schutzgruppe wird hydrogenolytisch entfernt. Das Derivat 3 mit freier α -Aminogruppe wird in Gegenwart eines Kondensationsmittels, z.B. N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid, mit N⁴-Benzoyl-1-carboxymethyl-cytosin 4 zur Reaktion gebracht. Dabei resultiert 5. Alternativ ist die Verknüpfung auch unter Verwendung von Aktivestern, z.B. Pentafluorphenylestern der 1-Carboxymethylnukleobasen möglich.

Der Methylester in 5 wird in Gegenwart einer Base verseift. Die Benzoat-Schutzgruppe wird nicht angegriffen.
 10

Die Peptid-Nukleinsäure 6 ist für den Einsatz in der Festphasen-Peptidsynthese unter "Boc-Bedingungen" geeignet.

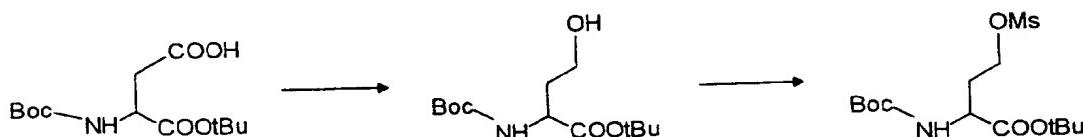
Derivate anderer Nukleobasen und anderer α,ω -Diaminocarbonsäuren, wie z.B. Lysin und 2,4-Dianiino-buttersäure sind analog zugänglich. Außerdem können anstelle der L-Aminosäurederivate auch die D-Aminosäurederivate eingesetzt werden.
 15

5.2 Monomere für Peptid-Nukleinsäuren mit 2-Aminobutyryl-glycin-Backbone

Als Beispiel für die Monomerensynthese wird der Thyminbaustein angeführt:

20

25



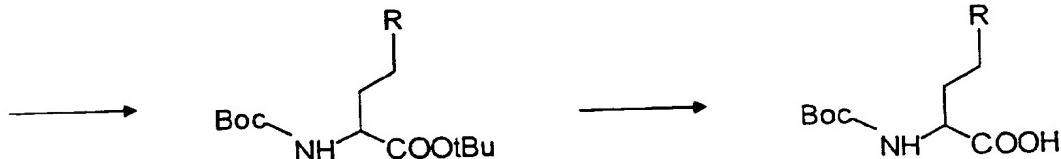
7

8

9

30

35



10 R = N³-Bz-Thymin
 40 11 R = Thymin

12 R = Thymin

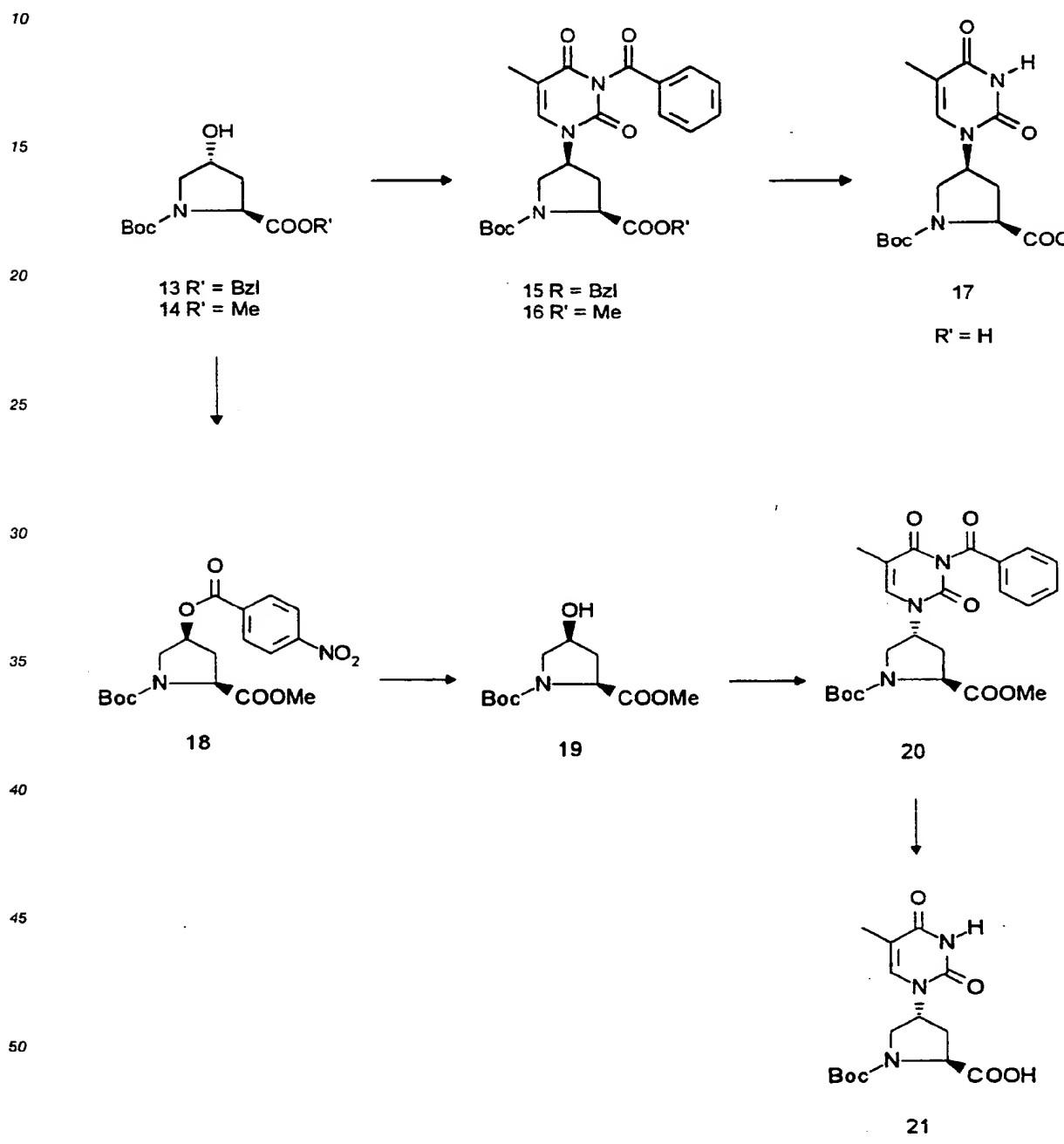
N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-Asparaginsäure wird in einem aprotischen dipolaren Lösungsmittel mit einem komplexen Hydrid zu N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-Homoserin-tert.-butylester 8 reduziert (außer der L-Asparaginsäure lässt sich die Synthese auch mit D-Asparaginsäure durchführen). Die Hydroxylgruppe wird in eine heterocyclische Nukleobase (z.B. 10) substituiert. Abgangsgruppe überführt (z.B. zu 9) und gegen eine heterocyclische Nukleobase (z.B. 12) substituiert. Anschließend werden die Schutzgruppen abgespalten und die α -Aminofunktion geschützt (z.B. 12). Das 2-Aminobutyryl-glycin-Backbone erhält man bei der Oligomerisierung dadurch, daß alternierend der 2-Aminobutyryl-Baustein und ein Glycin-Baustein verwendet werden.
 45
 50 Andere Backbone-Typen erhält man ganz einfach durch Verwendung anderer Spacer anstelle des Glycins bei der Oligomerisierung.

5.3 Monomere für Peptid-Nukleinsäuren mit Pyrrolidin-2-carboxyl-glycin-Backbone

55 Als Beispiel für die Monomerensynthese wird der Thyminbaustein aufgeführt:
 Ein N- und C-terminal geschützter Hydroxyprolin-Baustein (z.B. 13 oder 14) wird in einem aprotischen Lösungsmittel in einer Mitsunobu Reaktion mit einer Nukleobase umgesetzt, wobei z.B. 15 oder 16 erhalten wird. Anschließend wird der Ester gespalten und bei 15 oder 16 zusätzlich die Nukleobase entschützt, so

daß man 17 erhält. Ausgehend vom L-trans-Hydroxyprolinderivat 14 erhält man dabei das L-cis-Pyrrolidin-2-carbonsäureprodukt 17. Um in die Reihe der L-trans-Pyrrolidin-2-carbonsäureprodukte zu gelangen benötigt man L-cis-Hydroxyprolinderivate, welche man durch Chiralitätsumkehr in der 4-Position aus den L-trans-Hydroxyprolinderivaten erhält (z.B. auf dem Weg von 14 in einer Mitsunobu Reaktion über 18 nach 19). Der weitere Syntheseweg zu 21 erfolgt dann analog zu den Umsetzungen von 14 nach 17. Außer den L-cis- und den L-trans-Produkten lassen sich auch die D-cis und die D-trans Produkte herstellen.

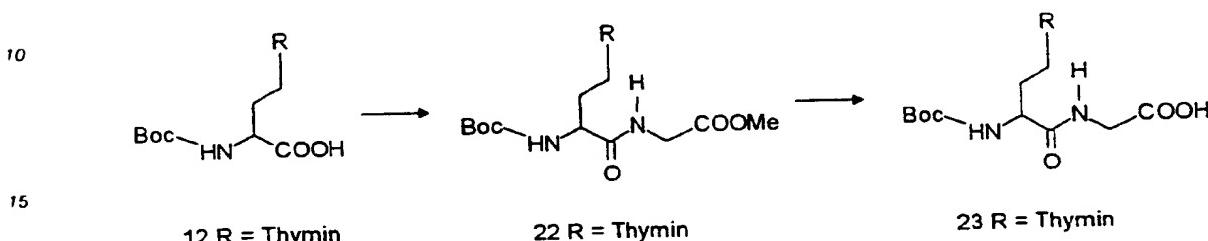
Andere Backbonetypen erhält man durch Verwendung anderer Spacer anstelle des Glycins bei der Oligomerisierung.



Dipeptidbausteine für Peptid-Nukleinsäuren mit 2-Aminobutyryl-glycin-Backbone

Zur Synthese der Dipeptide wird z.B. N-Boc-4-(thymin-1-yl)-2-L-aminobuttersäure 12 mit Glycinmethylester in Gegenwart von EDCI·HCl und HOBr·H₂O zu 22 gekuppelt. Anschließend wird der Ester verseift, was zur Verbindung 23 führt.

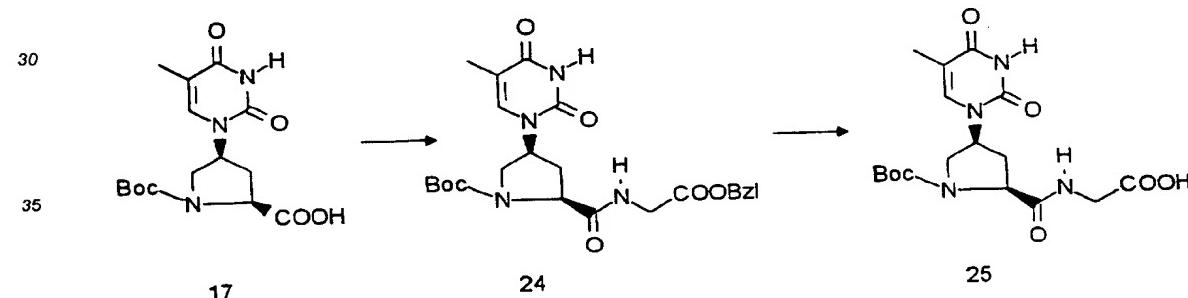
Außer Glycin lassen sich auf vergleichbarem Weg auch andere natürliche oder unnatürliche Aminosäuren ankuppeln. Die erhaltenen Dipeptide dienen dann zur Oligomerisierung.



Dipeptidbausteine für Peptid-Nukleinsäuren mit Pyrrololidin-2-carboxyl-glycin-Backbone

Zur Synthese der Dipeptide wird z.B. 2S,4S-N-Boc-4-(thymin-1-yl)pyrrolidin-2-carbonsäure 17 mit Glycinmethylester in Gegenwart von EDCI•HCl und HOBT•H₂O zu 24 gekuppelt. Anschließend wird der Ester verseift was zur Verbindung 25 führt.

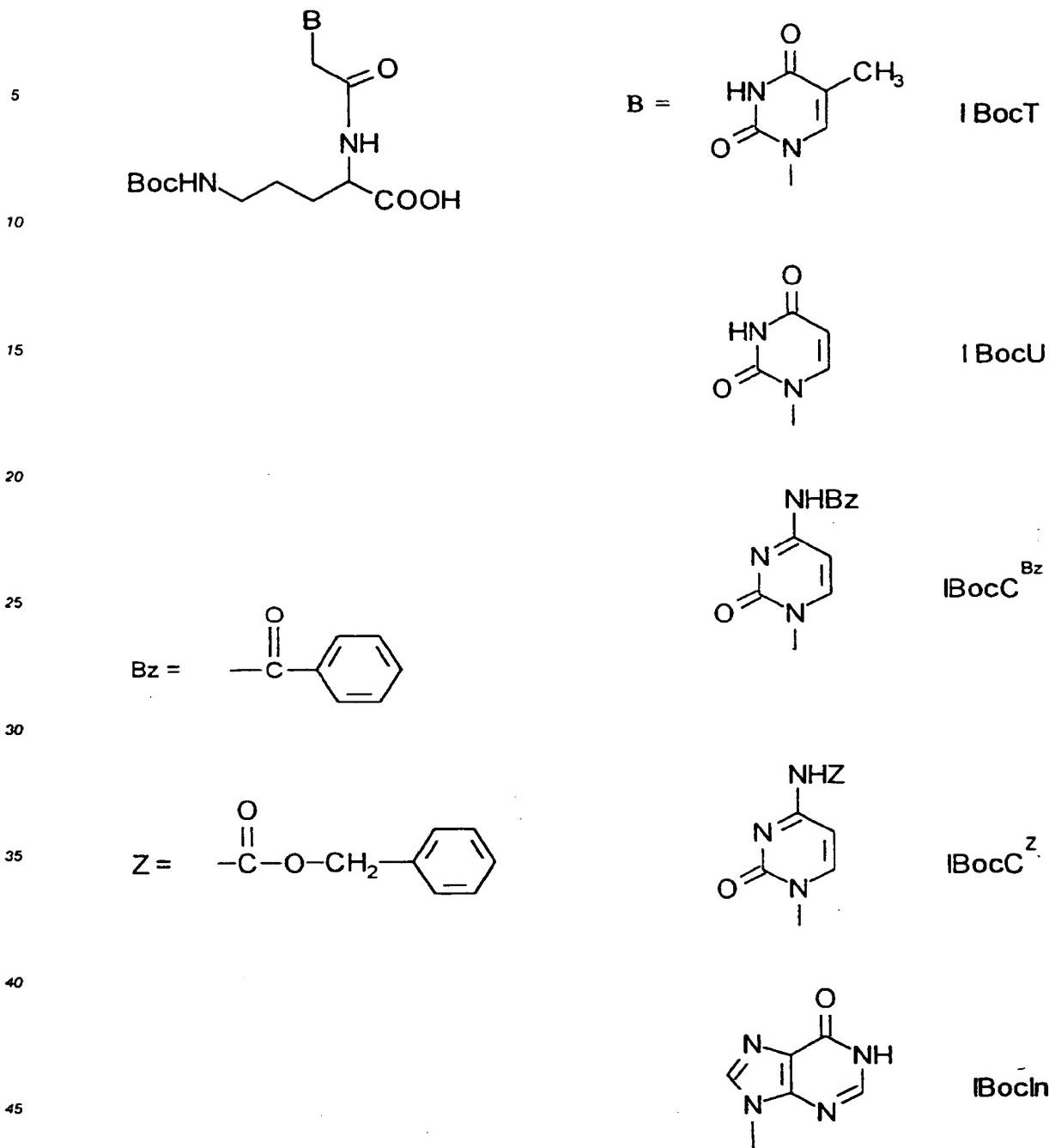
Außer Glycin lassen sich auf vergleichbarem Weg auch andere natürliche oder unnatürliche Aminosäuren ankuppeln. Die erhaltenen Dipeptide dienen dann zur Oligomerisierung.



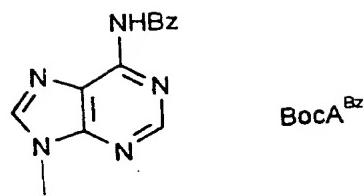
Oligomeren-Synthesen

Die Verknüpfung der Bausteine zu Oligomeren erfolgt durch Festphasenpeptidsynthese. Als polymere Träger wurden PAM-, MBHA- oder HMP-Resins der Firma Applied Biosystems eingesetzt. Die Bausteine werden in Analogie zur konventionellen Peptidsynthese entweder nach dem Fmoc- oder Boc-Verfahren verknüpft. Die Aktivierung der Bausteine erfolgt in N-Methyl-2-pyrrolidon durch Umsetzung mit Hydroxybenzotriazol/Dicyclohexylcarbodiimid oder Pentafluorphenol/Dicyclohexylcarbodiimid. Die Sequenzen werden im Anschluß durch Behandlung mit HF oder Trifluormethansulfonsäure (Boc-Methode, PAM- oder MBHA-Resin) oder durch Trifluoressigsäure (Fmoc-Methode, HMP-Resin) abgespalten. Die Reaktionsprodukte werden durch préparative HPLC an RP 8 mit einem ansteigenden Gradienten von Trifluoressigsäure in Acetonitril/Wasser isoliert. Nach dieser Methode wurden Sequenzen mit Kettenlängen bis 15 Bausteinen synthetisiert.

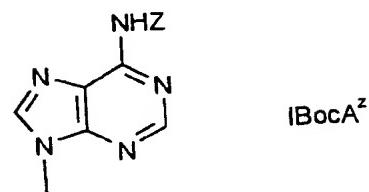
Zur Oligomerisierung wurden vorzugsweise nachfolgend aufgeführte α,ω -Diaminocarbonsäure-Bausteine eingesetzt. Alternativ zur Boc-Schutzgruppe kann ebenfalls die Fmoc-Schutzgruppe eingesetzt werden.



5

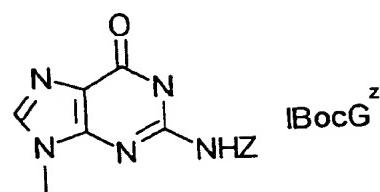


10



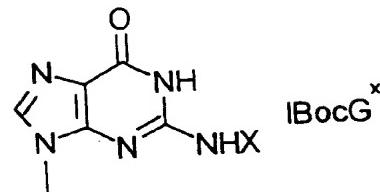
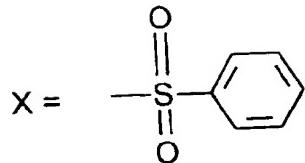
15

20



25

30



35

Dies ergibt folgende Syntheseäquivalente:

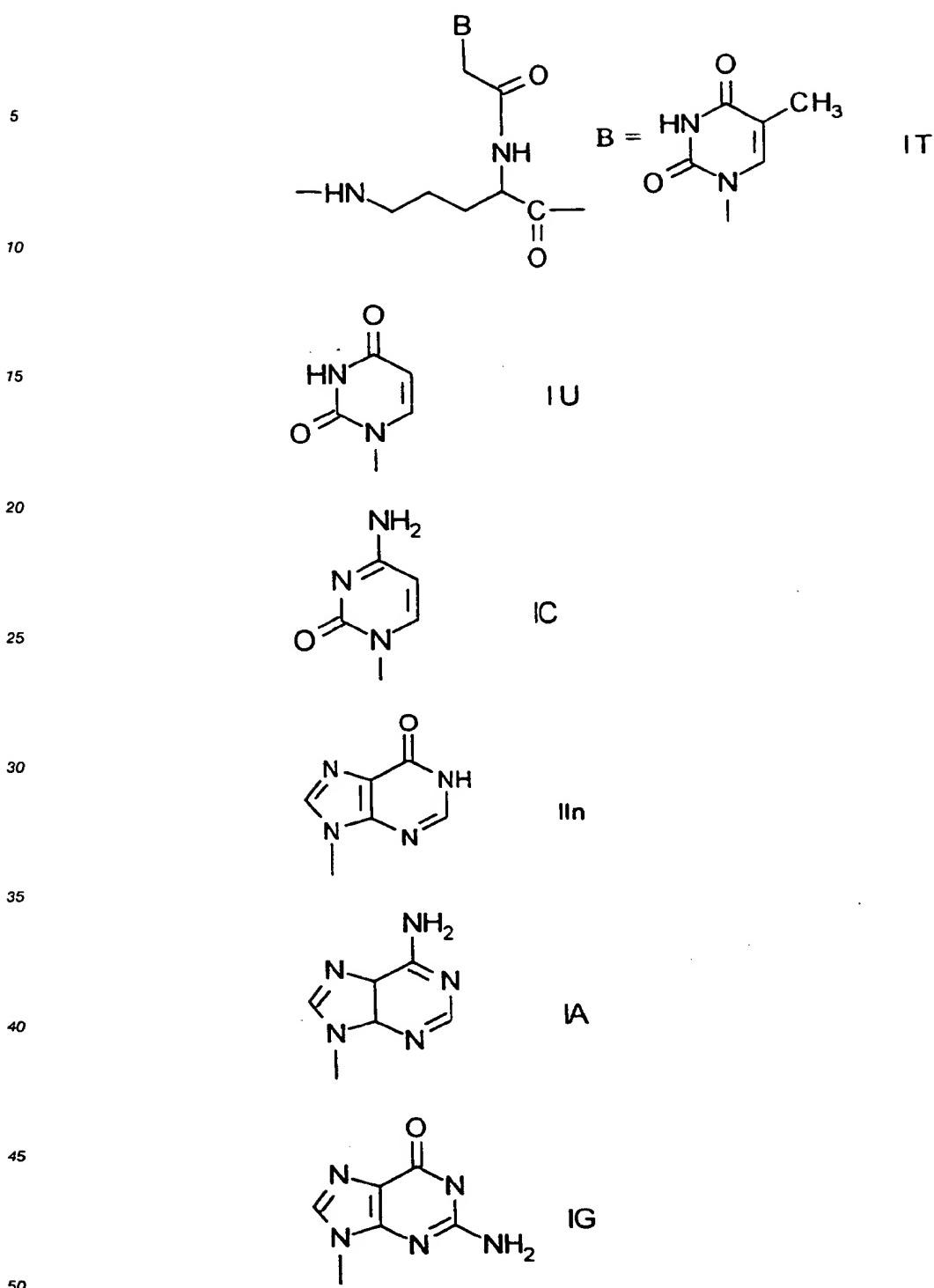
40

45

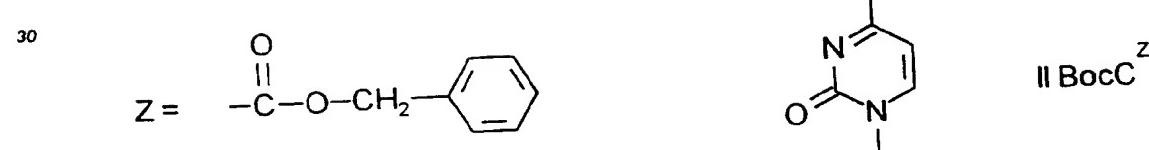
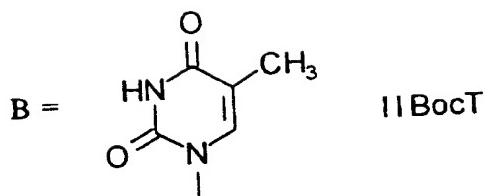
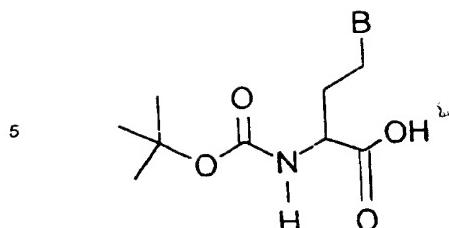
50

55

16



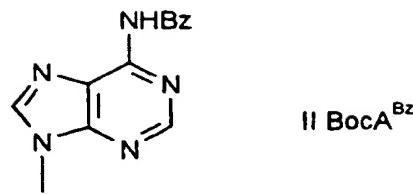
Zur Oligomerisierung wurden vorzugsweise nachfolgend aufgeführte 2-Aminobutyryl-Bausteine eingesetzt.
Alternativ zur Boc-Schutzgruppe kann ebenfalls die Fmoc-Schutzgruppe eingesetzt werden:



50

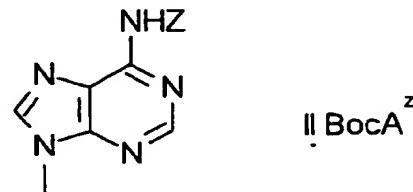
55

5



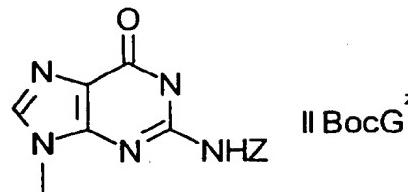
10

15

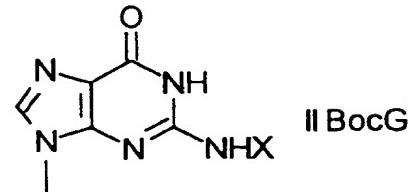
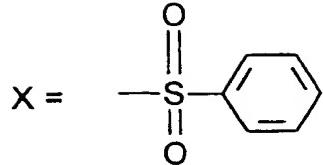


20

25



30



35

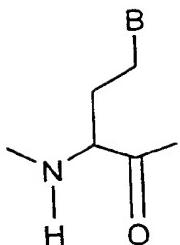
Dies ergibt folgende Syntheseäquivalente:

40

45

50

55



5

10

15

20

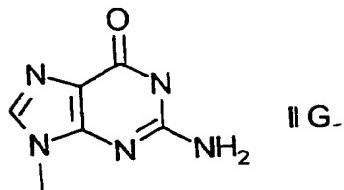
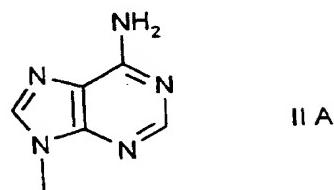
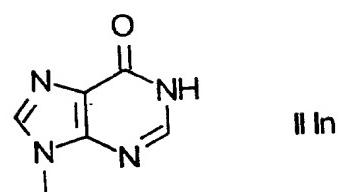
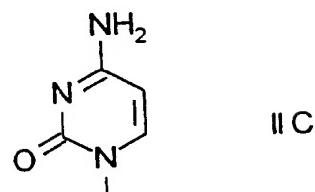
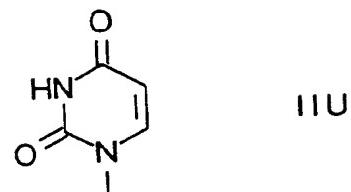
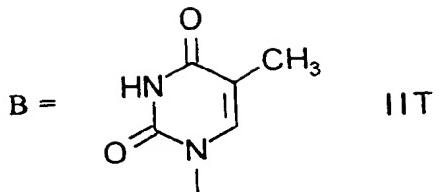
25

30

40

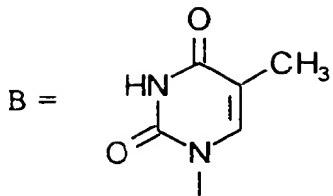
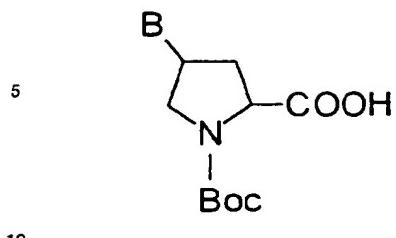
45

50

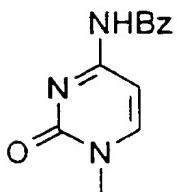
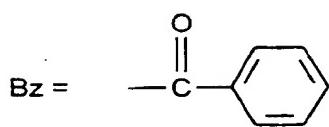


Zur Oligomerisierung wurden vorzugsweise nachfolgend aufgeführte Pyrrolidon-2-carboxyl-Bausteine eingesetzt. Alternativ zur Boc-Schutzgruppe kann ebenfalls die Fmoc-Schutzgruppe eingesetzt werden:

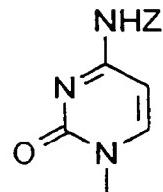
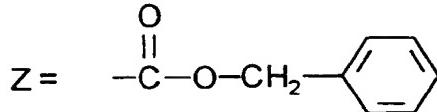
55



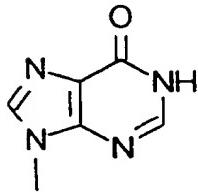
III BocT



III BocC₆^{Bz}

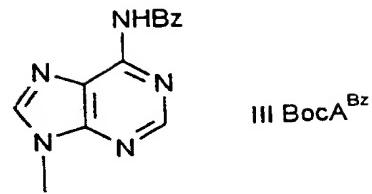


III BocC^z



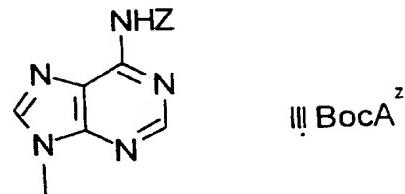
III Bochn

5



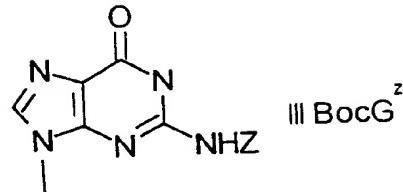
10

15



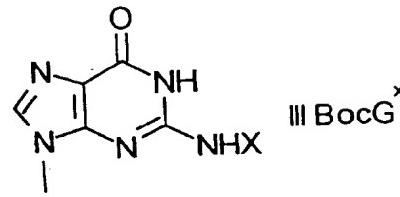
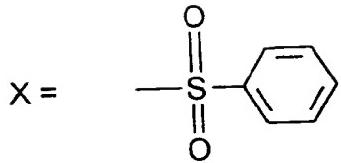
20

25



30

35

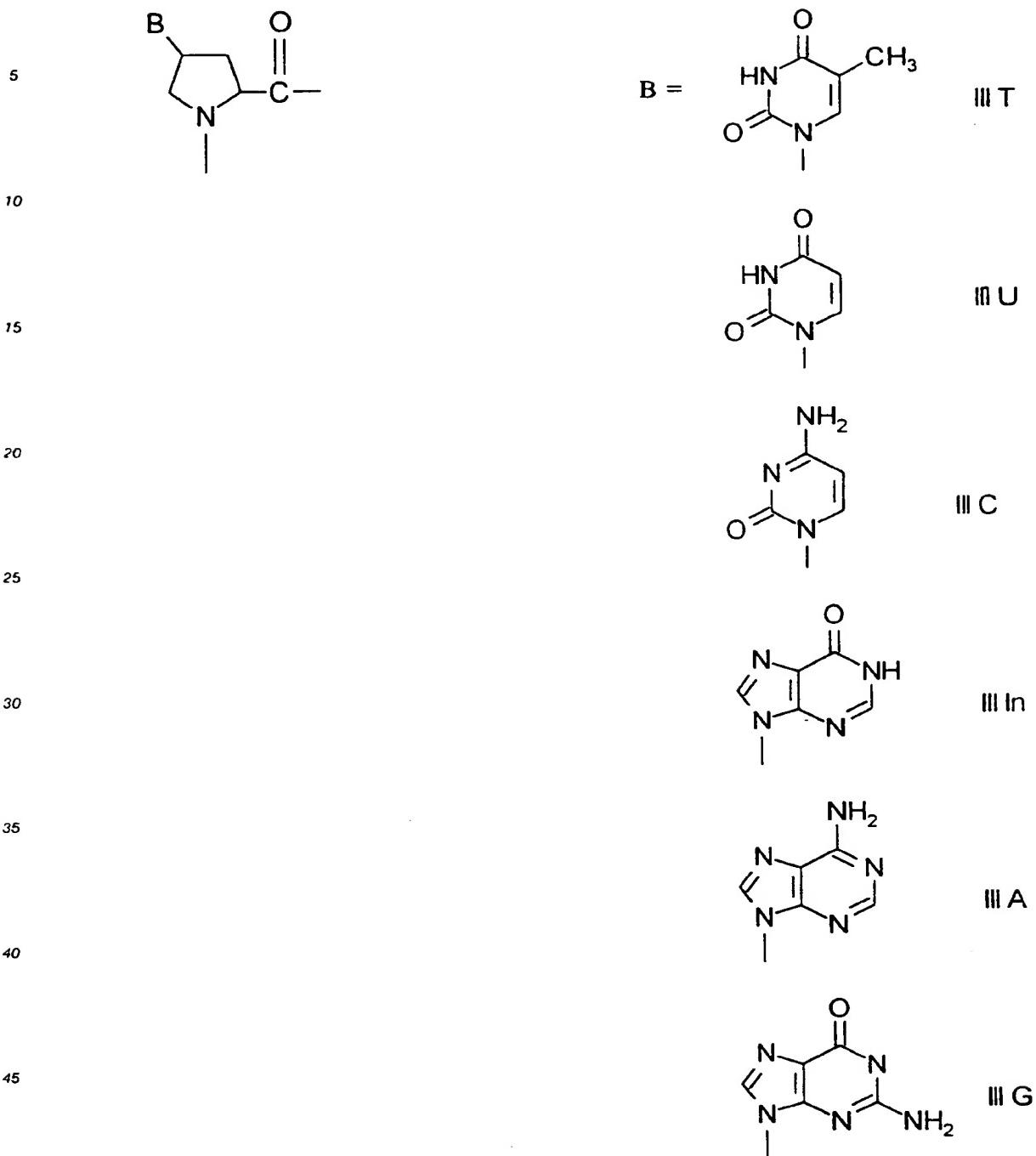


40 Dies ergibt folgende Syntheseäquivalente:

45

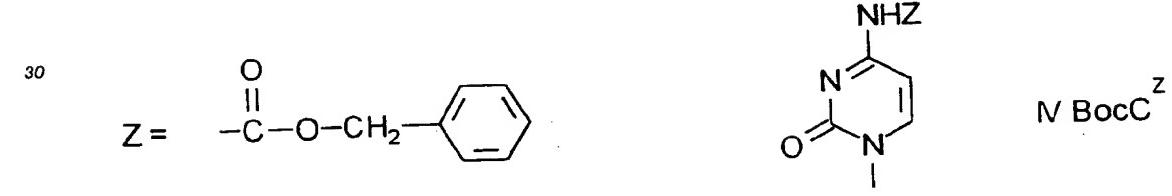
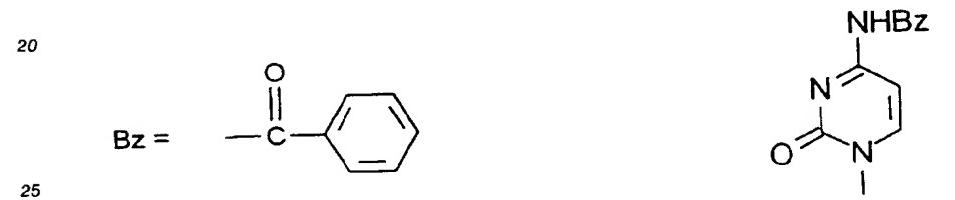
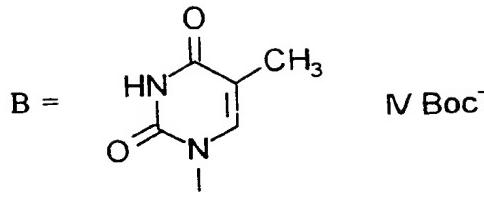
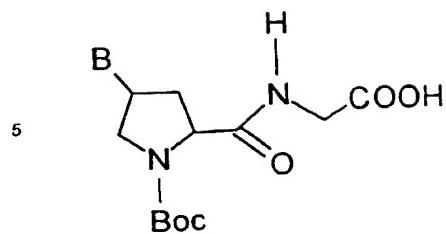
50

55



50 Zur Oligomerisierung wurden ebenfalls nachfolgend aufgeführte dimere Bausteine eingesetzt. Alternativ zur Boc-Schutzgruppe kann ebenfalls die Fmoc-Schutzgruppe eingesetzt werden:

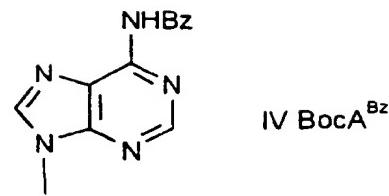
55



50

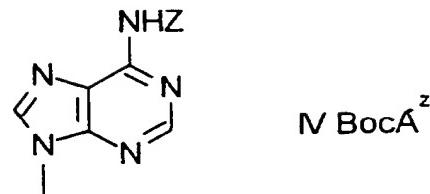
55

5



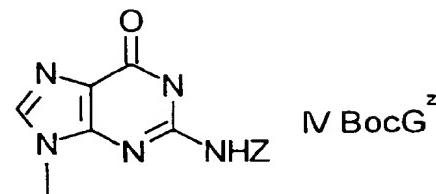
10

15



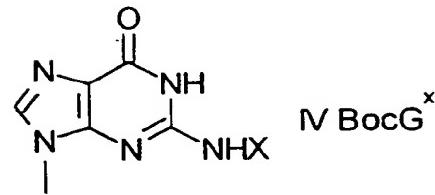
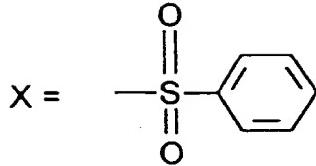
20

25



30

35



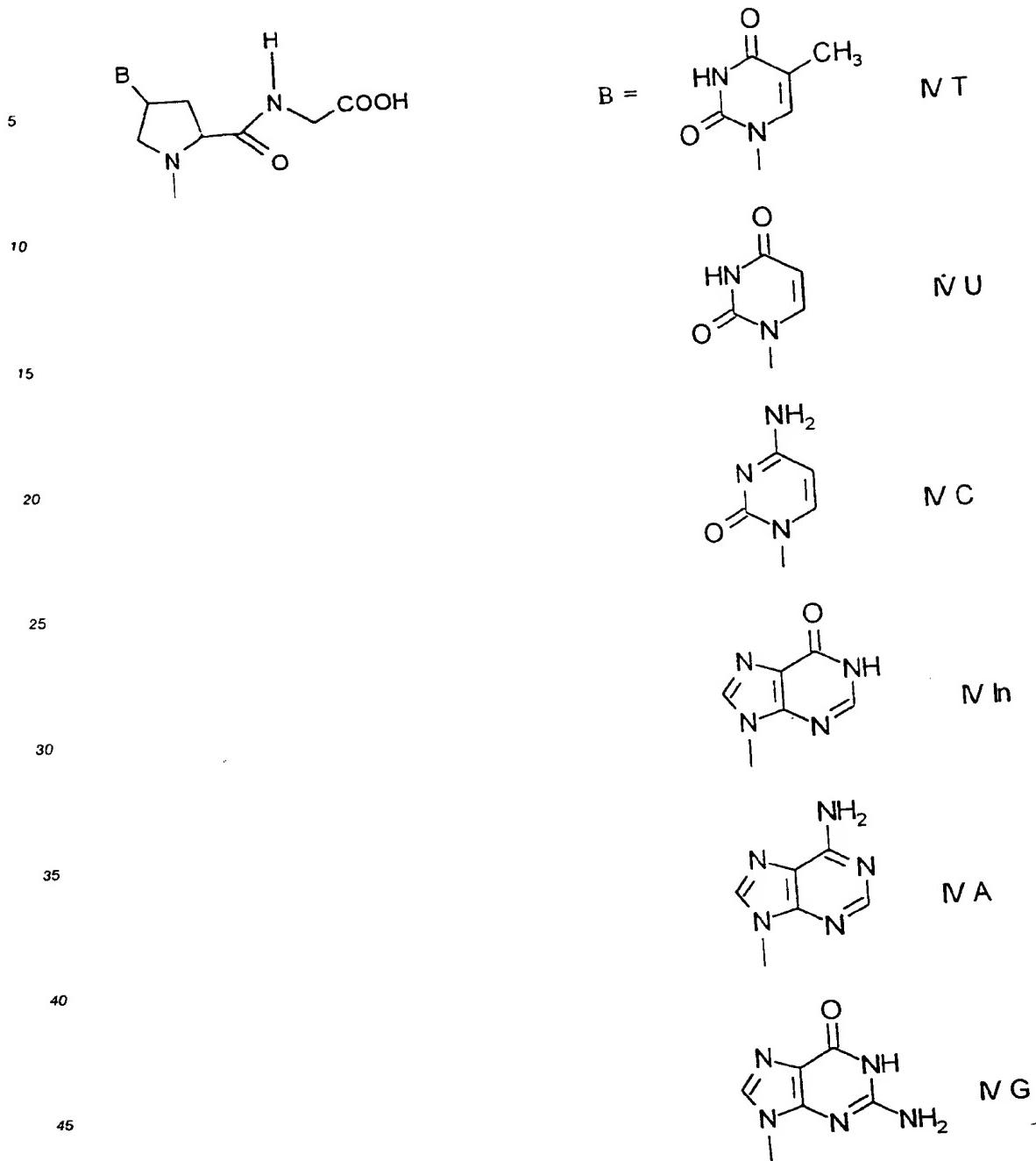
40

Dies ergibt folgende Syntheseäquivalente:

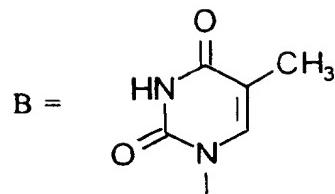
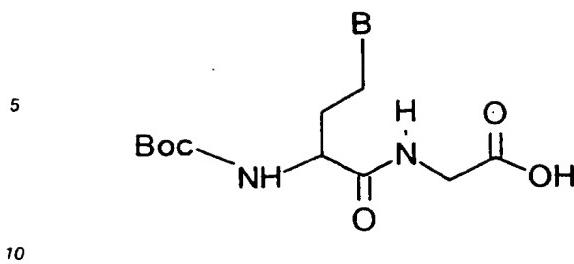
45

50

55



50 Im Fall 2-Aminobutyryl-Typs wurden ebenfalls dimere Bausteine zur Oligomerisierung eingesetzt:



V BocT

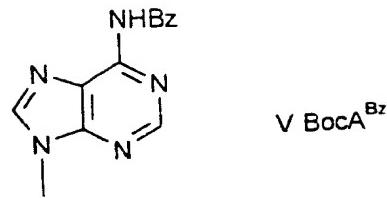


45

50

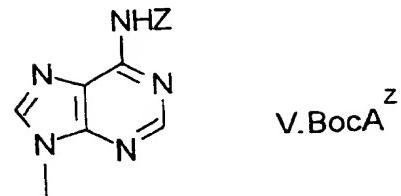
55

5



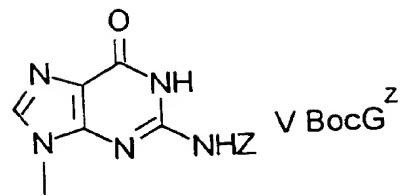
10

15

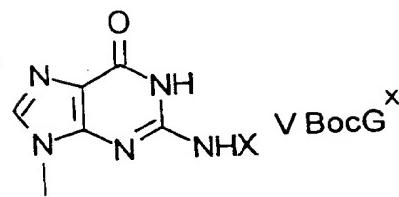
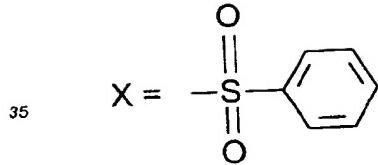


20

25



30

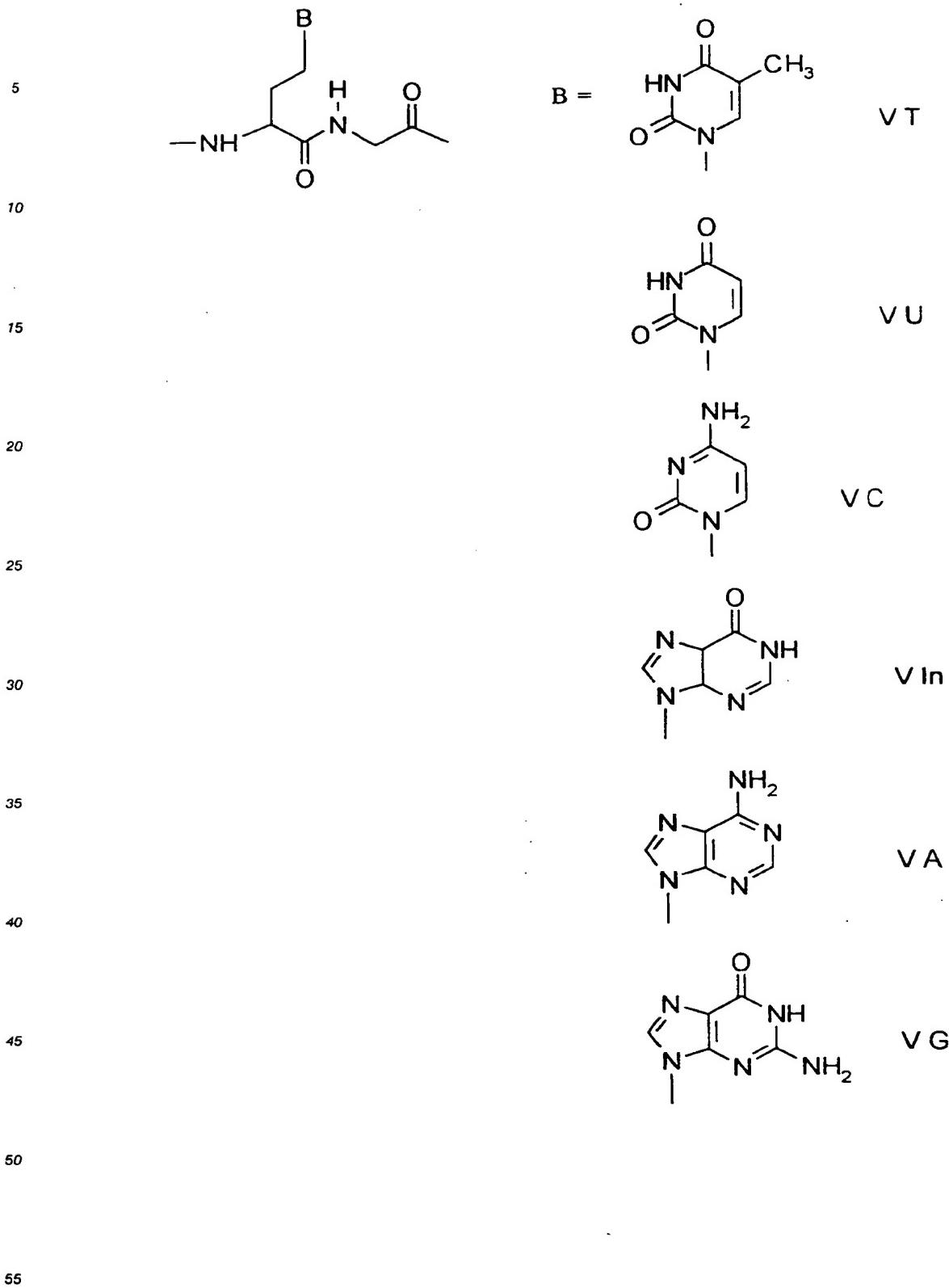


40 Das ergibt folgende 2-Aminobutyrylglycin-Syntheseäquivalente:

45

50

55



Beispiele

Monomere

5 Beispiel 1

α -N-Benzylloxycarbonyl- δ -N-tert.-butyloxycarbonyl-L-ornithinmethyleneester (2)

- Eine Lösung von α -N-Benzylxycarbonyl- δ -N-tert.-butyloxycarbonyl-L-ornithin (10,0 g; 27 mmol) in wasserfreiem Methanol (135 ml) wird mit Cäsiumpcarbonat auf pH = 9,0 bis 9,5 eingestellt und 30 Minuten bei Raumtemperatur nachgerührt. Anschließend wird eingeengt und 30 Minuten am Hochvakuum getrocknet. Der Rückstand wird in wasserfreiem N,N-Dimethylformamid (135 ml) aufgenommen und mit Jodmethan (4,37 g; 30 mmol) versetzt. Man beläßt 30 Minuten bei Raumtemperatur, engt in vacuo ein und destilliert (4,37 g; 30 mmol) versetzt. Man beläßt 30 Minuten bei Raumtemperatur, engt in vacuo ein und destilliert mehrfach mit Toluol nach. Das entstandene Öl wird in Chloroform (270 ml) aufgenommen und mit Wasser ausschüttelt. Die organische Phase wird getrocknet und eingeengt.

Ausbauten: 19,4 g (quantitativ)

Rf: 0.30 | Laufmittel: Toluol/EtOH 1:3

Beispiel 2

- δ -N-tert.-butyloxycarbonyl-L-ornithinmethylester (3)**

Das Produkt aus Beispiel 1 (12,6 g; 33 mmol) wird in Methanol (330 ml) bei Raumtemperatur und Normaldruck 46 h über Palladium auf Bariumsulfat (5 %; 9,96 g) hydriert. Anschließend wird vom

- 25 Katalysator abgesaugt (Celite) und eingeengt.

Ausbeute: 12.6 g (quantitativ).

Bl: 0.58 Laufmittel: Toluol/EtOH 4:1

Beispiel 3

- 30** δ-N-tert.-butyloxycarbonyl-α-N-(thymin-1-yl)acetyl-L-ornithine

Einer Lösung von 1-Carboxymethylthymin (4,22 g; 23 mmol) in wasserfreiem N,N-Dimethylformamid (60 ml) wird eine Lösung von Pentafluorphenol (4,22 g; 23 mmol) in wasserfreiem N,N-Dimethylformamid (20 ml) hinzugefügt. Anschließend wird bei 0 °C N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (4,74 g; 23 mmol), gelöst in wasserfreiem N,N-Dimethylformamid (20 ml), langsam zugetropft. Die Reaktionslösung wird 3 h nachgekürtzt, wobei man auf Raumtemperatur aufwärmten lässt. Der ausgefallene Feststoff wird abfiltriert, mit N,N-Dimethylformamid nachgewaschen und zur Lösung δ-N-tert.-butyloxycarbonyl-L-ornithin (4,45 g; 19 mmol), gelöst in N,N-Dimethylformamid, bei 0 °C zugetropft. Man röhrt weitere 21 h bei Raumtemperatur, engt in *vacuo* ein, destilliert mehrfach mit Toluol nach und chromatographiert an Kieselgel mit Chloroform/Methanol (2:1) als Laufmittel.

Ausbeute: 7,70 g (quantitativ)
 Rf: 0.78 Laufmittel: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 1:1

45 Beispiel 4

N⁴-Benzyl-1-tert.-butyloxycarbonylmethylcytosine

- Zu einer Suspension von N⁴-Benzoylcytosin (21,5 g; 0,1 mol) und Kaliumcarbonat (13,8 g; 0,1 mol) in
 wasserfreiem N,N-Dimethylformamid (2,15 l) wird bei Raumtemperatur langsam Bromessigsäure-tert.-butylester (24 ml; 0,15 mol) zugetropft. Das heterogene Gemisch wird 20 h heftig bei Raumtemperatur verrührt, anschließend von unlöslichen Edukt abgesaugt, in *vacuo* eingeengt, mehrfach mit Toluol nachdestilliert, der Rückstand mit Chloroform (1,0 l) aufgenommen, einmal mit Wasser (0,3 l) ausgeschüttelt und zügig die Phasen getrennt. Die organische Phase wird nochmals filtriert und eingeengt.
 Ausbeute: 15,23 g (46 %).
 Rf: 0,33 Laufmittel Toluol/EtOH 10:1

Beispiel 5**N⁴-Benzoyl-1-carboxymethylcytosin (4)**

5 Das Produkt aus Beispiel 4 wird in Trifluoressigsäure (170 ml) gelöst und 1 h 45 min bei Raumtemperatur belassen. Anschließend wird fünfmal mit Toluol codestilliert und das Produkt 24 h im Exsikkator über Phosphorpentoxid/Kaliumhydroxid getrocknet.
 Ausbeute: 11,8 g (93 %).
 Rf: 0,1 Laufmittel: Toluol/EtOH 1:1

10

Beispiel 6**α-N-(N⁴-Benzoylcytosin-1-yl)acetyl-δ-N-tert.-butyloxycarbonyl-L-ornithinmethylester (5)**

15 N⁴-Benzoyl-1-carboxymethylcytosin (15,76 g; 58 mmol) und δ-tert.-Butyloxycarbonyl-L-ornithinmethylester (9,61 g; 39 mmol) werden in wasserfreiem N,N-Dimethylformamid (520 ml) suspendiert und mit N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (11,92 g; 58 mmol) versetzt. Das Gemisch wird 1 h bei Raumtemperatur gerührt, danach in vacuo eingeengt und mehrfach mit Toluol nachdestilliert. Das Rohprodukt wird chromatographisch an Kieselgel gereinigt (Laufmittel: Toluol/Ethanol 8:1).
 20 Ausbeute: 5,21 g (27 %).
 Rf: 0,47 Laufmittel: Toluol/EtOH 4:1

Beispiel 7**25 α-N-(N⁴-Benzoylcytosin-1-yl)acetyl-δ-N-tert.-butyloxycarbonyl-L-ornithin (6)**

Eine Lösung des Produktes aus Beispiel 6 (4,80 g; 8,7 mmol) in Dioxan/Wasser (5:1; 70 ml) wird mit Lithiumhydroxid-Hydrat (440 mg; 10,5 mmol) versetzt und 1,5 h bei Raumtemperatur belassen. Nachfolgend wird mit 0,5 N Salzsäure neutralisiert und eingeengt. Das Produkt kristallisiert aus Methanol.

30 Ausbeute: 2,09 g (45 %).

Beispiel 8**N-Boc-L-Homoserin-tert.-butylester (8)**

35

N-Boc-Asparaginsäure-tert.-butylester (15,4 g; 53,1 mmol) wird in abs. THF vorgelegt und auf 0 °C gekühlt. Bei dieser Temperatur wird 1 eq. Triethylamin gefolgt von 1 eq. Chlorameisensäureethylester zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird 15 min bei 0 °C und 5 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird vom ausgefallenen Triethylaminhydrochlorid abgesaugt und das Filtrat direkt weiter umgesetzt.

40 Das Filtrat wird zu einer Suspension von NaBH₄ in THF, die auf 0 °C vorgekühlt ist, getropft und bei dieser Temperatur 15 bis 20 min gerührt. Danach wird das Eisbad entfernt und für weiter 30 bis 40 min bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Reaktion wird durch Zugabe an 1N HCl gequenched. Anschließend werden die Phasen getrennt und die organische Phase nacheinander je 3 mal mit 100 ml 1N HCl, ges. NaHCO₃- und ges. NaCl-Lösung ausgeschüttelt. Die organische Phase wird abgetrennt, über Na₂SO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingeengt. Zurück bleibt ein klares Öl.
 45 Ausbeute: 12 g (82,2 %).
 Rf: 0,66 Laufmittel: CH₂Cl₂/MeOH 9:1

Beispiel 9

50

N-Boc-γ-methansulfonyloxy-L-homoserin-tert.-butylester (9)

N-Boc-L-Homoserin-tert.-butylester (13 g; 47,2 mmol) wird in abs. Pyridin gelöst und die Lösung auf 0 °C abgekühlt. Bei dieser Temperatur werden 1,1 eq. Methansulfonsäurechlorid zugetropft. Anschließend lässt man 5 h bei Raumtemperatur röhren. Nach beendeter Reaktion wird das Pyridin abdestilliert. Der Rückstand wird mit Essigsäureethylester überschichtet und nacheinander je 3 mal mit 100 ml 1N HCl, ges. NaHCO₃- und ges. NaCl-Lösung ausgeschüttelt. Die organische Phase wird abgetrennt, über Na₂SO₄ getrocknet und zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wird in wenig Essigsäureethylester aufgenommen

und das Produkt durch Zugabe an n-Hexan ausgefällt.

Ausbeute: 12,9 g (77 %).

Rf: 0,76 Laufmittel: Essigsäureethylester/n-Hexan 2:1

Smp: 93 °C

5

Beispiel 10a

N-Boc-4-(N³-benzoyl-thymin-1-yl)-2-L-aminobuttersäure-tert.-butylester (10)

10 N³-Benzoyl-thymin (2 eq.) wird in abs. DMF vorgelegt und mit 2 eq. K₂CO₃ versetzt. Es wird 5 min bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird das Mesylat (9) (1,18 g; 3,36 mmol) gelöst in DMF zugetropft. Nach beendeter Zugabe wird auf 60 °C aufgeheizt und bei dieser Temperatur 4 h gerührt. Nach beendeter Reaktion wird das DMF abdestilliert, der Rückstand mit Essigsäureethylester überschichtet und nacheinander je 3 mal mit 20 ml 1N HCl, ges. NaHCO₃- und ges. NaCl-Lösung ausgeschüttelt. Die Essigsäureethylesterphase wird über Na₂SO₄ getrocknet und dann zur Trockne eingetrocknet. Das erhaltene Rohprodukt wird schließlich an Kieselgel mit Essigsäureethylester/n-Hexan 1:1 als Eluent chromatographiert.
15 Ausbeute: 897 mg (54,8 %) weißer Schaum.
Rf: 0,72 Laufmittel: Essigsäureethylester/n-Hexan 2:1

20

Beispiel 10b

N-Boc-4-(N³-benzoyl-thymin-1-yl)-2-L-aminobuttersäure-tert.-butylester (10)

25 2,5 eq. Triphenylphosphin und 2,5 eq. DEAD werden in abs. THF gelöst und 5 min bei Raumtemperatur gerührt. Nach dieser Zeit wird das N³-Benzoyl-thymin (2 eq.) zugegeben und erneut 5 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend tropft man das in abs. DMF gelöste (8) (3,02 g; 10,98 mmol) zu und lässt über Nacht bei Raumtemperatur röhren. Nach beendeter Reaktion wird das DMF abdestilliert und das Rohprodukt an Kieselgel mit Essigsäureethylester/n-Hexan 1:1 als Laufmittel chromatographiert.
30 Ausbeute: 3,19 g (58,5 %) weißer Schaum.
Rf: 0,72 Laufmittel: Essigsäureethylester/n-Hexan 2:1

Beispiel 11a

N-Boc-4-(thymin-1-yl)-2-L-aminobuttersäure-tert.-butylester (11)

35

Verbindung (10) (3,19 g; 5,96 mmol) wird mit NH₃ in Methanol über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird das Lösungsmittel abdestilliert. Das erhaltene Rohprodukt wird ohne weitere Reinigung für die Abspaltung der Boc- und der OtBu-Schutzgruppe eingesetzt.

40

Beispiel 11b

N-Boc-4-(thymin-1-yl)-2-L-aminobuttersäure-tert.-butylester (11)

45

2 eq. Thymin und 2 eq. K₂CO₃ werden in abs. DMF bei Raumtemperatur 5 min gerührt. Anschließend wird Verbindung (9) (1,18 g; 3,36 mmol) gelöst in abs. DMF zugetropft und 4 h bei 60 °C gerührt. Nach beendeter Reaktion wird das DMF abdestilliert und das Rohprodukt mit Essigsäureethylester überschichtet. Die organische Phase wird nacheinander je 3 mal mit 20 ml 1N HCl, ges. NaHCO₃- und ges. NaCl-Lösung ausgeschüttelt. Die organische Phase wird abgetrennt, mit Na₂SO₄ getrocknet und zur Trockne eingedampft. Schließlich wird an Kieselgel mit Essigsäureethylester/n-Hexan 2:1 als Eluent chromatographiert.
50 Ausbeute: 650 mg (50 %).
Rf: 0,53 Laufmittel: Essigsäureethylester/n-Hexan 2:1
Smp: 184 bis 187 °C

Beispiel 12

4-(Thymin-1-yl)-2-L-aminobuttersäure* TFA

5 Verbindung (11) wird in TFA (2 ml pro mmol) 2 h im Ultraschallbad behandelt. Die erhaltene Lösung wird anschließend in abs. Ether pipettiert, wobei das TFA-Salz ausfällt. Das erhaltene TFA-Salz wird abfiltriert und im Ölpumpenvakuum über KOH getrocknet.
Ausbeute: quantitativ.

10 **Beispiel 13**

4-(Thymin-1-yl)-2-L-aminobuttersäure* HBr

15 Verbindung (11) wird in HBr/Essigsäure (5 ml pro mmol) gelöst und 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird die Lösung in abs. Ether pipettiert, wobei das HBr-Salz ausfällt. Das erhaltene HBr-Salz wird abfiltriert und im Ölpumpenvakuum über KOH getrocknet.
Ausbeute quantitativ.
Smp: > 200 °C Zersetzung

20 **Beispiel 14**

N-Boc-4-(thymin-1-yl)-2-L-aminobuttersäure (12)

25 Die Einführung der Boc-Schutzgruppe ausgehend von dem TFA-Salz aus Beispiel 12 erfolgt auf dem gleichen Weg wie für das HBr-Salz aus Beispiel 13. Exemplarisch wird die Schutzgruppeneinführung ausgehend von dem HBr-Salz beschrieben.

Das HBr-Salz (10,7 g; 34,7 mmol) wird in THF vorgelegt. Der pH der Lösung wird durch Zugabe an Triethylamin auf pH 8 eingestellt. Danach tropft man 1,1 eq. Di-tert.-butyl-dicarbonat gelöst in THF zu und läßt bei Raumtemperatur über Nacht röhren. Während der Reaktion wird darauf geachtet, daß der pH-Wert nicht unter den Wert 8 fällt. Nach beendeter Reaktion wird das THF abdestilliert, der Rückstand mit Essigsäureethylester überschichtet und der pH durch Zugabe an 1N HCl auf 1 bis 2 eingestellt. Danach werden die Phasen getrennt, die organische Phase über Na₂SO₄ getrocknet und zur Trockne eingedampft. Das erhaltene Rohprodukt wird an Kieselgel mit CH₂Cl₂/MeOH/HOAc 90:10:1 chromatographiert.

Ausbeute: 6 g (53 %).

35 Rf: 0,53 Laufmittel CH₂Cl₂/MeOH/HOAc 80:20:1

Smp: 124 °C

Beispiel 15

40 **N-Fmoc-4-(thymin-1-yl)-2-L-aminobuttersäure**

Das TFA-Salz aus Beispiel 12 (3,4 g; 9,66 mmol) wird in einem Lösungsmittelgemisch aus Aceton/Wasser (30 ml : 30 ml) gelöst und mit 2 eq. NaHCO₃ versetzt. Dann gibt man 1 eq. 9-Fluorenylmethylsuccinimidylcarbonat zu und läßt bei Raumtemperatur über Nacht röhren. Nach beendeter Reaktion wird das Aceton abdestilliert, die wäßrige Phase mit Chloroform versetzt und anschließend mit 1N HCl auf pH 2 angesäuert. Danach werden die Phasen getrennt. Die Chloroform-Phase wird schließlich 3 mal mit je 50 ml 0,1N HCl, ges. NaHCO₃- und ges. NaCl-Lösung ausgeschüttelt. Die Phasen werden getrennt. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet und dann zur Trockne eingedampft. Das Produkt wird an Kieselgel mit CH₂Cl₂/MeOH/HOAc 90:10:1 als Laufmittel gesäult.

50 Ausbeute: 2,7 g (55,3 %).

Rf: 0,80 Laufmittel: CH₂Cl₂/MeOH/HOAc 80:20:1

Beispiel 16

55 **N-Boc-4-(N⁴-benzoyl-cytosin-1-yl)-2-L-aminobuttersäure-tert.-butylester**

2 eq. N⁴-Benzoyl-cytosin und 2 eq. K₂CO₃ werden in abs. DMF 5 min bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird Verbindung (9) (13,35 g; 37,8 mmol) gelöst in DMF zugetropft. Die Lösung wird auf 60 °C

erhitzt und bei dieser Temperatur 4 h gerührt. Nach beendeter Reaktion wird das DMF abdestilliert, der Rückstand mit Essigsäureethylester überschichtet und nacheinander je 3 mal mit 100 ml 1N HCl, ges. NaHCO₃- und ges. NaCl-Lösung ausgeschüttelt. Die organische Phase wird schließlich über Na₂SO₄ getrocknet und zur Trockne eingedampft. Das erhaltene Rohprodukt wird an Kieselgel mit Essigsäureethylester/n-Hexan 1:1 chromatographiert.

5 Ausbeute: 6,1 g (35 %).

Rf: 0,55 Laufmittel: CH₂Cl₂/MeOH 9:1

Beispiel 17

10 4-(N⁴-Benzoyl-Cytosin-1-yl)-2-L-aminobuttersäure* TFA
N-Boc-4-(N⁴-benzoyl-cytosin-1-yl)-2-L-aminobutyryl-tert.-butylester wird in TFA (2 ml pro mmol) 2 h im Ultraschallbad behandelt. Die erhaltene Lösung wird anschließend in abs. Ether pipettiert, wobei das TFA-Salz ausfällt. Das erhaltene TFA-Salz wird abfiltriert und im Ölpumpenvakuum über KOH getrocknet.

15 Ausbeute: quantitativ.

Beispiel 18

20 N-Boc-4-(N⁴-benzoyl-cytosin-1-yl)-2-L-aminobuttersäure
Das TFA-Salz (5,5 g; 10,43 mmol) aus Beispiel 17 wird in einem Lösungsmittelgemisch aus Dioxan/Wasser (25 ml : 15 ml) gelöst und mit 3 eq. Na₂CO₃ versetzt. Die Lösung wird 5 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend werden 1,3 eq. Di-tert.-butyl-dicarbonat gelöst in 15 ml Dioxan zugetropft und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Reaktion wird das Dioxan abdestilliert, die wäßrige Phase mit Essigsäureethylester überschichtet und mit 1N HCl auf pH 2 angesäuert. Danach werden die Phasen getrennt und die organische Phase nacheinander 3 mal mit je 100 ml 1N HCl, ges. NaHCO₃- und ges. NaCl-Lösung ausgeschüttelt. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet und dann zur Trockne eingedampft. Das Produkt wird aus Essigsäureethylester/n-Hexan gefällt.

25 Ausbeute: 3,65 g (83 %).

30 Rf: 0,50 Laufmittel: CH₂Cl₂/MeOH/HOAc 80:20:1

Beispiel 19

35 N-Boc-4-(N⁴-Z-cytosin-1-yl)-2-L-aminobuttersäure-tert.-butylester
N⁴-Z-Cytosin (2 eq.) wird in abs. DMF vorgelegt und mit 2 eq. K₂CO₃ versetzt. Es wird 5 min bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird das Mesylat (9) (11 g; 31,1 mmol) gelöst in DMF zugetropft. Nach beendeter Zugabe wird auf 60 °C aufgeheizt und bei dieser Temperatur 4 h gerührt. Nach beendeter Reaktion wird das DMF abdestilliert, der Rückstand mit Essigsäureethylester überschichtet und nacheinander 3 mal mit je 100 ml 1N HCl, ges. NaHCO₃- und ges. NaCl-Lösung ausgeschüttelt. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet und dann zur Trockne eingedampft. Das erhaltene Rohprodukt wird schließlich an Kieselgel mit Essigsäureethylester/n-Hexan 1:1 als Laufmittel chromatographiert.

40 Ausbeute: 9 g; (57,6 %).

45 Rf: 0,21 Laufmittel: Essigsäureethylester/n-Hexan 2:1

Beispiel 20

4-(N⁴-Z-Cytosin-1-yl)-2-L-aminobuttersäure* TFA
50 N-Boc-4-(N⁴-Z-cytosin-1-yl)-2-L-aminobutyryl-tert.-butylester (9 g; 18,9 mmol) wird in TFA (2 ml pro mmol) 2 h im Ultraschallbad behandelt. Die erhaltene Lösung wird anschließend in abs. Ether pipettiert, wobei das TFA-Salz ausfällt. Das erhaltene TFA-Salz wird abfiltriert und im Ölpumpenvakuum über KOH getrocknet.

55 Ausbeute: quantitativ.

Beispiel 21

N-Boc-4-(N⁴-Z-cytosin-1-yl)-2-L-aminobuttersäure

- 5 Das TFA-Salz (6,74 g; 14,6 mmol) aus Beispiel 20 wird in einem Lösungsmittelgemisch aus Dioxan/Wasser (2:1) gelöst und mit 3 eq. Na₂CO₃ versetzt. Die Lösung wird 5 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend werden 1,3 eq. Ditert.-butyl-dicarbonat gelöst in wenig Dioxan zugetropft und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Reaktion wird das Dioxan abdestilliert, die wäßrige Phase mit Essigsäureethylester überschichtet und mit 1N HCl auf pH 2 angesäuert. Danach werden die Phasen getrennt und die organische Phase nacheinander 3 mal mit je 100 ml 1N HCl, ges. NaHCO₃- und ges. NaCl-Lösung ausgeschüttelt. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet und dann zur Trockne eingedampft. Das Produkt wird aus Essigsäureethylester/n-Hexan gefällt.
 Ausbeute: 4 g; (61,4 %).
 Rf: 0,85 Laufmittel: CH₂Cl₂/MeOH/HOAc 80:20:1
 15 Smp.: 190 °C

Beispiel 22

2S,4S-N-Boc-4-(N³-benzoyl-thymin-1-yl)-pyrrolidin-2-carbonsäure-methylester (16)

- 20 2,5 eq. Triphenylphosphin und 2,5 eq. DEAD werden in abs. THF gelöst und 5 min bei Raumtemperatur gerührt. Nach dieser Zeit wird das N³-Benzoyl-thymin (2 eq.) zugegeben und erneut 5 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend tropft man den in abs. DMF gelösten 2S,4R-N-Boc-hydroxyprolin-methylester (1,23 g; 5 mmol) zu und läßt über Nacht bei Raumtemperatur röhren. Nach beendeter Reaktion wird das DMF abdestilliert und das Rohprodukt an Kieselgel mit Essigsäureethylester/n-Hexan 1:1 als Eluent chromatographiert.
 Ausbeute: 1,2 g (52,5 %).
 Rf: 0,40 Laufmittel: Essigsäureethylester/n-Hexan 2:1

Beispiel 23

2S,4S-N-Boc-4-(N³-benzoyl-thymin-1-yl)-pyrrolidin-2-carbonsäure-benzylester (15)

- 25 2,5 eq. Triphenylphosphin und 2,5 eq. DEAD werden in abs. THF gelöst und 5 min bei Raumtemperatur gerührt. Nach dieser Zeit wird das N³-Benzoyl-thymin (2 eq.) zugegeben und erneut 5 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend tropft man den in abs. DMF gelösten 2S,4R-N-Boc-hydroxyprolin-benzylester (11 g; 34,3 mmol) zu und läßt über Nacht bei Raumtemperatur röhren. Nach beendeter Reaktion wird das DMF abdestilliert und das Rohprodukt an Kieselgel mit Essigsäureethylester/n-Hexan 1:1 als Eluent chromatographiert.
 40 Ausbeute: 10,86 g (58,3 %)
 Rf: 0,68 Laufmittel Essigsäureethylester/n-Hexan 2:1

Beispiel 24a

- 45 2S,4S-N-Boc-4-(N³-benzoyl-thymin-1-yl)-pyrrolidin-2-carbonsäure

2S,4S-N-Boc-4-(N³-benzoyl-thymin-1-yl)-pyrrolidin-2-carboxy-methylester (5,8 g; 12,7 mmol) wird in Isopropanol gelöst und mit 1,1 eq. 1N NaOH versetzt. Anschließend wird bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Reaktion (DC-Kontrolle, Laufmittel CH₂Cl₂/MeOH/HOAc 90:10:1) wird das Isopropanol abdestilliert, der Rückstand mit Essigsäureethylester überschichtet und mit 1N HCl auf pH 1 angesäuert. Danach werden die Phasen getrennt, die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet und dann zur Trockne eingedampft. Das auf diese Weise erhaltene Rohprodukt wird ohne weitere Aufreinigung weiter umgesetzt (siehe Beispiel 25).
 Rf: 0,60 Laufmittel: CH₂Cl₂/MeOH 9:1

Beispiel 24b2S,4S-N-Boc-4-(N³-benzoyl-thymin-1-yl)-pyrrolidin-2-carbonsäure

- 5 2S,4S-N-Boc-4-(N³-benzoyl-thymin-1-yl)-pyrrolidin-2-carboxy-benzylester (10,86 g; 20,3 mmol) wird in MeOH gelöst und das Reaktionsgefäß 10 min mit N₂ gespült. Nach Zugabe von trockenem Katalysator (Pd auf Aktivkohle 10 %) wird in schwachem Wasserstoffstrom bei Normaldruck hydriert. Nach beendeter Reaktion (DC-Kontrolle, CH₂Cl₂/MeOH/HOAc 90:10:1) wird vom Katalysator abfiltriert und gründlich nachgewaschen. Das Filtrat wird zur Trockne eingedampft und an der Ölspalte getrocknet.
- 10 Ausbeute: 9,03 g (quantitativ).
Rf: 0,60 Laufmittel: CH₂Cl₂/MeOH 9:1

Beispiel 25

15 2S,4S-N-Boc-4-(thymin-1-yl)-pyrrolidin-2-carbonsäure (17)

- 15 2S,4S-N-Boc-4-(N³-benzoyl-thymin-1-yl)-pyrrolidin-2-carbonsäure (9,03 g; 20,3 mmol) wird mit NH₃, in Methanol über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird das Lösungsmittel abdestilliert. Das erhaltene Rohprodukt wird an Kieselgel mit CH₂Cl₂/MeOH/HOAc 90:10:1 als Laufmittel gesäuert.
- 20 Ausbeute: 3,55 g (51,7 %).
Rf: 0,33 Laufmittel: CH₂Cl₂/MeOH/HOAc 80:20:1
Smp.: 228 °C

Beispiel 2625 2S,4S-N-Boc-4-(N⁴-benzoyl-cytosin-1-yl)-pyrrolidin-2-carboxy-benzylester

- 25 2,5 eq. Triphenylphosphin und 2,5 eq. DEAD werden in abs. THF gelöst und 5 min bei Raumtemperatur gerührt. Nach dieser Zeit wird das N³-Benzoyl-thymin (2 eq.) zugegeben und erneut 5 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend tropft man das in abs. DMF gelöste 2S,4R-N-Boc-hydroxyprolin-methylester (7,5 g; 23,36 mmol) zu und lässt über Nacht bei Raumtemperatur röhren. Nach beendeter Reaktion wird das DMF abdestilliert und das Rohprodukt an Kieselgel mit Essigsäureethylester/n-Hexan 1:1 als Eluent chromatographiert.
Ausbeute: 5,6 g (47,2 %).
Rf: 0,56 Laufmittel: Essigsäureethylester/n-Hexan 2:1

Beispiel 272S,4S-N-Boc-4-(N⁴-benzoyl-cytosin-1-yl)-pyrrolidin-2-carbonsäure

- 40 2S,4S-N-Boc-4-(N⁴-benzoyl-cytosin-1-yl)-pyrrolidin-2-carboxy-benzylester (1,9 g; 3,75 mmol) wird in MeOH gelöst und das Reaktionsgefäß 10 min mit N₂ gespült. Nach Zugabe von trockenem Katalysator (Pd auf Aktivkohle 10 %) wird in schwachem Wasserstoffstrom bei Normaldruck hydriert. Nach beendeter Reaktion (DC-Kontrolle, CH₂Cl₂/MeOH/HOAc 90:10:1) wird vom Katalysator abfiltriert und gründlich nachgewaschen. Das Filtrat wird zur Trockne eingedampft und an der Ölspalte getrocknet.
- 45 Ausbeute: 1,51 g (96,8 %).
Rf: 0,05 Laufmittel: CH₂Cl₂/MeOH 9:1

Beispiel 2850 2S,4S-N-Boc-4-(N⁴-benzoyl-cytosin-1-yl)-pyrrolidin-2-carboxyl-glycin-benzylester

- 50 2S,4S-N-Boc-4-(N⁴-benzoyl-cytosin-1-yl)-pyrrolidin-2-carbonsäure (5,9 g; 14,2 mmol) wird in DMF vorgelegt und die Lösung auf -30 °C abgekühlt. Bei dieser Temperatur gibt man 1,3 eq. HOBr gefolgt von 1,3 eq. EDCI·HCl zu und lässt 10 bis 15 min bei max. -15 °C röhren. In der Zwischenzeit wird das Hydrochlorid von Glycin-benzylester (1,2 eq.) in DMF aufgenommen und mit N-Ethylmorpholin neutralisiert. Diese Lösung wird nach der Voraktivierungszeit zu der auf -15 °C gekühlten Reaktionslösung getropft. Man lässt 1 h bei max. -10 °C und anschließend über Nacht bei Raumtemperatur röhren. Nach beendeter Reaktion wird

das DMF abdestilliert, der Rückstand mit Essigsäureethylester überschichtet und 3 mal mit je 100 ml 1N HCl, ges. NaHCO₃- und ges. NaCl-Lösung ausgeschüttelt. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet und dann zur Trockne eingedampft. Das Rohprodukt wird schließlich an Kieselgel mit Essigsäureethylester/n-Hexan 2:1 chromatographiert.

- 5 Ausbeute: 4,2 g (51,2 %).
Rf: 0,25 Laufmittel: Essigsäureethylester/n-Hexan 2:1

Beispiel 29

- 10 2S,4S-N-Boc-4-(N⁴-benzoyl-cytosin-1-yl)-pyrrolidin-2-carboxyl-glycin

2S,4S-N-Boc-4-(N⁴-benzoyl-cytosin-1-yl)-pyrrolidin-2-carboxyl-glycin-benzylester (3,67 g; 6,38 mmol) wird in MeOH gelöst und das Reaktionsgefäß 10 min. mit N₂ gespült. Nach Zugabe von trockenem Katalysator (Pd auf Aktivkohle 10 %) wird in schwachem Wasserstoffstrom bei Normaldruck hydriert. Nach beendeter Reaktion (DC-Kontrolle, CH₂Cl₂/MeOH/HOAc 90:10:1) wird vom Katalysator abfiltriert und gründlich nachgewaschen. Das Filtrat wird zur Trockne eingedampft und an der Ölumppe getrocknet. Ausbeute: 2,78 g (89,7 %).

Beispiel 30

- 20 2S,4S-N-Boc-4-(N⁴-Z-cytosin-1-yl)-pyrrolidin-2-carboxyl-methylester

25 eq. Triphenylphosphin und 2,5 eq. DEAD werden in abs. THF gelöst und 5 min bei Raumtemperatur gerührt. Nach dieser Zeit wird das N⁴-Z-Cytosin (2 eq.) zugegeben und erneut 5 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend tropft man das in abs. DMF gelöste 2S,4R-N-Boc-hydroxyprolin-methylester (10 g; 40 mmol) zu und lässt über Nacht bei Raumtemperatur röhren. Nach beendeter Reaktion wird das DMF abdestilliert und das Rohprodukt an Kieselgel mit Essigsäureethylester/n-Hexan 1:1 als Eluent chromatographiert.

- Ausbeute: 15,6 g (81 %).
30 Rf 0,60 Laufmittel: Essigsäureethylester/n-Hexan 2:1

Beispiel 31

- 2S,4S-N-Boc-4-(N⁴-Z-cytosin-1-yl)-pyrrolidin-2-carbonsäure

35 2S,4S-N-Boc-4-(N⁴-Z-cytosin-1-yl)-pyrrolidin-2-carboxyl-methylester (15,6 g; 33 mmol) wird in Isopropanol gelöst und mit 1,1 eq. 1N NaOH versetzt. Anschließend wird bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Reaktion (DC-Kontrolle, Laufmittel CH₂Cl₂/MeOH/HOAc 90:10:1) wird das Isopropanol abdestilliert, der Rückstand mit Essigsäureethylester überschichtet und mit 1N HCl auf pH 1 angesäuert. Danach werden die Phasen getrennt, die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet und dann zur Trockne eingedampft. Das auf diese Weise erhaltene Rohprodukt wird an Kieselgel mit CH₂Cl₂/MeOH/HOAc 90:10:1 als Laufmittel chromatographiert.

- Ausbeute: 7,27 g (48 %).
Rf: 0,73 Laufmittel: CH₂Cl₂/MeOH/HOAc 80:20:1

Beispiel 32

- 2S,4S-N-Boc-4-(4-Nitro-benzyloxy)-pyrrolidin-2-carbonsäuremethylester (18)

50 2S,4R-N-Boc-hydroxyprolin-methylester (60,05 g; 269 mmol), 1,2 eq. Triphenylphosphin (85,93 g; 327 mmol) und 1,25 eq. para-Nitrobenzoësäure (56,05 g; 335 mmol) werden in abs. THF unter Schutzgas gelöst. Die erhaltene Lösung wird auf 0 °C abgekühlt. Bei dieser Temperatur wird Azodicarbonsäurediethylester gelöst in abs. THF zugetropft. Anschließend lässt man auf Raumtemperatur auftauen und für weitere 70 h bei Raumtemperatur röhren. Danach wird das Lösungsmittel abdestilliert und der Rückstand mit Ether behandelt. Von den dabei ausfallenden Nebenprodukten wird abgesaugt, das Filtrat wird einrotiert und das erhaltene Rohprodukt wird an Kieselgel mit Essigsäureethylester/n-Hexan (im Verhältnis 2:1) aufgereinigt und schließlich durch Chromatographie an Kieselgel mit CH₂Cl₂/MeOH (im Verhältnis 60:1) endgereinigt.

Ausbeute: 100 g (94,15 %)
Rf: 0,85 Laufmittel: Essigsäureethylester/n-Hexan 2:1

Beispiel 33

5 2S,4S-N-Boc-hydroxyprolin-methylester (19)

2S,4S-N-Boc-4-(4-Nitro-benzoyloxy)-pyrrolidin-2-carbonsäuremethylester (11,82 g; 30 mmol) wird in ca. 300 ml abs. MeOH gelöst. Zu dieser Lösung tropft man eine Lösung von Natriummethylat (1,62 g; 30 mmol) in Methanol und läßt 30 min. bei Raumtemperatur röhren. Anschließend wird mit 1N HCl ein pH von 5 eingestellt. Danach wird das Methanol abdestilliert. Die wäßrige Phase wird mehrmals mit Essigsäureethylester extrahiert und die vereinigten organischen Phasen werden schließlich mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und dann zur Trockne eingedampft. Das erhaltene Rohprodukt wird an Kieselgel mit Essigsäureethylester/n-Hexan (im Verhältnis 2:1) chromatographiert.

15 Ausbeute: 6,98 g (94,9 %)
Rf: 0,35 Laufmittel: Essigsäureethylester/n-Hexan 2:1

Beispiel 34

20 2S,4R-N-Boc-4-(N³-benzoyl-thymin-1-yl)-pyrrolidin-2-carboxy-methylester (20)

2,5 eq. Triphenylphosphin und 2,5 eq. DEAD werden in abs. THF gelöst und 5 min. bei Raumtemperatur gerührt. Nach dieser Zeit wird das N³-Benzoyl-thymin (2 eq.) zugegeben und erneut 5 min. bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend tropft man das in abs. DMF gelöste 2S,4S-N-Boc-hydroxyprolin-methylester (30 g; 122 mmol) zu und läßt über Nacht bei Raumtemperatur röhren. Nach beendeter Reaktion wird das DMF abdestilliert und das Rohprodukt an Kieselgel mit Essigsäureethylester/n-Hexan 1:1 als Eluent chromatographiert.

Ausbeute: 38,0 g (67,9 %)
Rf: 0,27 Laufmittel: Essigsäureethylester/n-Hexan 1:1

30 30 Beispiel 35

2S,4R-N-Boc-4-(N³-benzoyl-thymin-1-yl)-pyrrolidin-2-carbonsäure

35 2S,4R-N-Boc-4-(N³-benzoyl-thymin-1-yl)-pyrrolidin-2-carboxy-methylester (38 g; 83 mmol) wird in Isopropanol gelöst und mit 1,1 eq. 1N NaOH versetzt. Anschließend wird bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Reaktion (DC-Kontrolle, Laufmittel CH₂Cl₂/MeOH/HOAc 90:10:1) wird das Isopropanol abdestilliert, der Rückstand mit Essigsäureethylester überschichtet und mit 1N HCl auf pH 1 angesäuert. Danach werden die Phasen getrennt, die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet und dann zur Trockne eingedampft. Das auf diese Weise erhaltene Rohprodukt wird ohne weitere Aufreinigung weiter umgesetzt (siehe Beispiel 36).

Beispiel 36

45 2S,4R-N-Boc-4-(thymin-1-yl)-pyrrolidin-2-carbonsäure (21)

2S,4R-N-Boc-4-(N³-benzoyl-thymin-1-yl)-pyrrolidin-2-carbonsäure wird mit Ammoniak in Methanol über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird das Lösungsmittel abdestilliert. Das erhaltene Rohprodukt wird an Kieselgel mit CH₂Cl₂/MeOH/HOAc 90:10:1 als Laufmittel gesäult.

50 Ausbeute: 12,6 g (44,8 %)
Rf: 0,25 Laufmittel CH₂Cl₂/MeOH/HOAc 90:10:1

Beispiel 37

55 2 S, 4R-N-Boc-N-(N⁴-benzyloxycarbonylcytosin-1-yl)-pyrrolidin-2-carbonsäuremethylester

3,28 g (12,5 mMol) Triphenylphosphin und 2,18 g (12,5 mMol) DEAD werden in 20 ml abs. THF gelöst und 5 min bei Raumtemperatur gerührt. Nach dieser Zeit werden 2,45 g (10 mMol) N⁴-Benzylloxycarbonyl-

cytosin zugegeben und erneut 5 min verrührt. Anschließend tropft man 1,23 g (5 mMol) N-Boc-L-cis-hydroxyprolinmethylester in DMF gelöst zu und läßt bei Raumtemperatur über Nacht röhren. Das DMF wird abdestilliert und der Rückstand mit Essigsäureethylester versetzt. Nun wird einmal mit gesättigter NaCl-Lösung ausgeschüttelt, die organische Phase über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und eingeengt. Der Rückstand wird an SiO_2 mit Methylchlorid/Methanol 30:1 als Eluent chromatographiert.

Ausbeute: 840 mg (35 % d.Th.)
RF: 0,7 Laufmittel $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ 30:1

Beispiel 38

10 2 S, 4R-N-Boc-4-(N⁴-benzyloxycarbonylcytosin-1-yl)-pyrrolidin-2-carbonsäure

580 mg (1,2 mmol) 2S,4R-N-Boc-4-(N⁴-Benzylloxycarbonylcytosin-1-yl)pyrrolidin-2-carbonsäuremethylester werden in 10 ml Dioxan und 2 ml H_2O gelöst und auf 10 °C gekühlt. Nun werden 1,2 ml (1,2 mmol) 1N NaOH bei 10 °C zugetropft und nach 5 h bei dieser Temperatur nochmals 0,6 ml (0,6 mmol) 1N NaOH. Es wird weitere 2 Stunden bei 10 °C verrührt und über Nacht im Kühlschrank stehen lassen. Die Lösung wird eingeengt, mit Essigsäureethylester versetzt und einmal mit 1N HCl ausgeschüttelt. Danach wird die organische Phase über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und eingeengt. Der Rückstand wird an Kieselgel mit $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ 10:1 als Eluent chromatographiert.

20 Ausbeute: 300 mg (53,0 % d.Th.)
RF: 0,17 Laufmittel $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ 10:1

Beispiel 39

25 2R, 4S-N-Boc-4-(N³-benzoyl-thymin-1-yl)-pyrrolidin-2-carbonsäuremethylester

69,5 (265 mMol) Triphenylphosphin und 46,1 g (265 mMol) DEAD werden in 400 ml abs. THF gelöst und 5 min bei Raumtemperatur verrührt. Nach dieser Zeit werden 48,8 g (212 mMol) N³-Benzoyl-thymin zugegeben und erneut 5 min bei Raumtemperatur verrührt. Anschließend tropft man 26,0 g (106 mMol). N-Boc-D-trans-hydroxyprolin-methylester in DMF gelöst zu und läßt über Nacht bei Raumtemperatur verrühren. Nach beendeter Reaktion wird das DMF abdestilliert, der Rückstand in Essigsäureethylester aufgenommen und einmal mit gesättigter NaCl-Lösung ausgeschüttelt. Die organische Phase wird über Na_2SO_4 getrocknet, abfiltriert und eingeengt. Das Rohprodukt wird an Kieselgel mit Essigsäureethylester/n-Hexan 1:1 als Eluent chromatographiert.

35 Ausbeute: 22,58 g (46,5 % d.Th.)
RF: 0,26 Laufmittel EE/n Hexan 1:1

Beispiel 40

40 2R,4S-N-Boc-4-(thymin-1-yl)-pyrrolidin-2-carbonsäure

1,18 g (2,5 mMol) 2R, 4S-N-Boc-4-(N³-benzoyl-thymin-1-yl)pyrrolidin-2-carboxymethylester werden in 20 ml Isopropanol und 10 ml Dioxan gelöst und auf 3 °C abgekühlt. Dann tropft man 5 ml (5 mMol) 1N NaOH bei 3 °C zu und verröhrt 7 Std. bei dieser Temperatur. Anschließend tropft man nochmal 2,5 ml (2,5 mMol) 1N NaOH zu und läßt über Nacht im Eisbad stehen. Die Lösung wird eingeengt und mit Essigsäureethylester und 1N HCl versetzt bis ein pH-Wert von 1 erreicht ist. Nun schüttelt man einmal mit Essigsäureethylester aus, trocknet die organische Phase über Na_2SO_4 und engt zur Trockne ein. Das Rohprodukt wird an Kieselgel mit $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}/\text{HOAc}$ 90:10:1 als Eluent chromatographiert.

50 Ausbeute: 430 mg (49,1 % d. Th)
RF: 0,23 Laufmittel $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}/\text{HOAc}$ 90:10:1

Beispiel 41

N-Boc-4-(thymin-1-yl)-2-L-aminobutyryl-glycin-methylester

55 N-Boc-4-(thymin-1-yl)-2-L-aminobuttersäure (6,0 g; 18,35 mMol) wird in DMF vorgelegt und die Lösung auf -30 °C abgekühlt. Bei dieser Temperatur gibt man 1,3 eq. HOBt gefolgt von 1,3 eq. EDCI/HCl zu und läßt 10 bis 15 min. bei maximal -15 °C röhren. In der Zwischenzeit wird das Hydrochlorid von Glycinnmethylester

ester (1,2 eq.) in DMF aufgenommen und mit N-Ethylmorpholin neutralisiert. Diese Lösung wird nach der Voraktivierungszeit zu der auf -15 °C gekühlten Reaktionslösung getropft. Man lässt 1 h bei maximal -10 °C und anschließend über Nacht bei Raumtemperatur röhren. Nach beendeter Reaktion wird das DMF abdestilliert, der Rückstand mit Essigsäureethylester überschichtet und 3 mal mit je 100 ml 1N HCl, ges. NaHCO₃- und ges. NaCl-Lösung ausgeschüttelt. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet und dann zur Trockne eingedampft. Das Rohprodukt wird schließlich an Kieselgel mit Essigsäureethylester/n-Hexan 2:1 chromatographiert.

Ausbeute: 3,9 g (53 %)
Rf: 0,56 Laufmittel: CH₂Cl₂/MeOH 9:1

10

Beispiel 42

N-Boc-4-(thymin-1-yl)-2-L-aminobutyryl-glycin (3,9 g; 10,1 mmol) wird in Isopropanol gelöst und mit 1,1 eq. 1N NaOH versetzt. Anschließend wird bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Reaktion (DC-Kontrolle, Laufmittel CH₂Cl₂/MeOH/HOAc 90:10:1) wird das Isopropanol abdestilliert, der Rückstand mit Essigsäureethylester überschichtet und mit 1N HCl auf pH 1 angesäuert. Danach werden die Phasen getrennt, die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet und dann zur Trockne eingedampft. Anschließend wird mit Essigsäureethylester überschichtet und mit 1N HCl angesäuert. Nach Phasentrennung wird die organische Phase über Na₂SO₄ getrocknet und dann zur Trockne eingedampft.

Ausbeute: 3,1 g (82 %)

20

Beispiel 43

2S,4S-N-Boc-4-(thymin-1-yl)-pyrrolidin-2-carboxy-glycin-benzylester

2S,4S-N-Boc-4-(thymin-1-yl)-2-carbonsäure (5,0 g; 14,7 mmol) wird in DMF vorgelegt und die Lösung auf -30 °C abgekühlt. Bei dieser Temperatur gibt man 1,3 eq. HOBt gefolgt von 1,3 eq. EDCI/HCl zu und lässt 10 bis 15 min. bei maximal -15 °C röhren. In der Zwischenzeit wird das Hydrochlorid von Glycinbenzylester (1,2 eq.) in DMF aufgenommen und mit N-Ethylmorpholin neutralisiert. Diese Lösung wird nach der Voraktivierungszeit zu der auf -15 °C gekühlten Reaktionslösung getropft. Man lässt 1 h bei maximal -10 °C und anschließend über Nacht bei Raumtemperatur röhren. Nach beendeter Reaktion wird das DMF abdestilliert, der Rückstand mit Essigsäureethylester überschichtet und 3 mal mit je 100 ml 1N HCl, ges. NaHCO₃- und ges. NaCl-Lösung ausgeschüttelt. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet und dann zur Trockne eingedampft. Das Rohprodukt wird schließlich an Kieselgel mit CH₂Cl₂/MeOH (im Verhältnis 95:5) chromatographiert. Zur weiteren Reinigung wird das schon recht saubere Produkt aus einem Gemisch aus Essigsäureethylester, Ether und n-Hexan ausgefällt.

Ausbeute: 3,7 g (51,8 %)
Rf: 0,67 Laufmittel: CH₂Cl₂/MeOH 9:1
Smp: 178 °C

40

Beispiel 44

2S,4S-N-Boc-4-(thymin-1-yl)-pyrrolidin-2-carboxy-glycin

2S,4S-N-Boc-4-(thymin-1-yl)-pyrrolidin-2-carboxyl-glycin-benzylester (3,7 g; 7,61 mmol) wird in MeOH gelöst und das Reaktionsgefäß 10 min. mit N₂ gespült. Nach Zugabe von trockenem Katalysator (Pd auf Aktivkohle 10 %) wird in schwachem Wasserstoffstrom bei Normaldruck hydriert. Nach beendeter Reaktion (DC-Kontrolle, CH₂Cl₂/MeOH/HOAc 90:10:1) wird vom Katalysator abfiltriert und gründlich nachgewaschen. Das Filtrat wird zur Trockne eingedampft und an der Ölspülung getrocknet.

Ausbeute: 2,7 g (89,5 %)

50

Beispiel 45

2S,4R-N-Boc-4-(thymin-1-yl)-pyrrolidin-2-carboxyl-glycin-benzylester

2S,4R-N-Boc-4-(thymin-1-yl)-pyrrolidin-2-carbonsäure (4,65 g; 13,7 mmol) wird in DMF vorgelegt und die Lösung auf -30 °C abgekühlt. Bei dieser Temperatur gibt man 1,3 eq. HOBt gefolgt von 1,3 eq. EDCI/HCl zu und lässt 10 bis 15 min. bei max. 15 °C röhren. In der Zwischenzeit wird das Hydrochlorid von

Glycinbenzylester (1,2 eq.) in DMF aufgenommen und mit N-Ethylmorpholin neutralisiert. Diese Lösung wird nach der Voraktivierungszeit zu der auf -15 °C gekühlten Reaktionslösung getropft. Man läßt 1 h bei maximal -10 °C und anschließend über Nacht bei Raumtemperatur röhren. Nach beendeter Reaktion wird das DMF abdestilliert, der Rückstand mit Essigsäureethylester überschichtet und 3 mal mit je 100 ml 1N HCl, ges. NaHCO₃- und ges. NaCl-Lösung ausgeschüttelt. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet und dann zur Trockne eingedampft.
 5 Ausbeute: 6,7 g (97,6 %)
 Rf: 0,56 Laufmittel: CH₂Cl₂/MeOH 9:1

10 **Beispiel 46**

2S,4R-N-Boc-4-(thymin-1-yl)-pyrrolidin-2-carboxyl-glycin

2S,4R-N-Boc-4-(thymin-1-yl)-pyrrolidin-2-carboxyl-glycin-benzylester (6,0 g; 12,3 mmol) wird in MeOH gelöst und das Reaktionsgefäß 10 min. mit N₂ gespült. Nach Zugabe von trockenem Katalysator (Pd auf Aktivkohle 10 %) wird in schwachem Wasserstoffstrom bei Normaldruck hydriert. Nach beendeter Reaktion (DC-Kontrolle, CH₂Cl₂/MeOH/HOAc 90:10:1) wird vom Katalysator abfiltriert und gründlich nachgewaschen. Das Filtrat wird zur Trockne eingedampft und an der Ölpumpe getrocknet.
 15 Ausbeute: 3,7 g (75,8 %)
 20 Rf: 0,25 Laufmittel: CH₂Cl₂/MeOH/HOAc 90:10:1

Oligomere

Beispiel 47

25 Festphasensynthese von H-(IT)₃-Gly-OH

120 mg (0,1 mmol) tert.-Butyloxycarbonyl-Glycin-PAM-Resin werden im Reaktionsgefäß vorgelegt. Die tert.-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe wird vor jedem Kopplungsschritt durch Behandlung mit Trifluoressigsäure abgespalten. Die Aktivierung von jeweils 136 mg (0,34 mmol) IBocT erfolgt durch Umsetzung mit 365 mg (2,7 mmol) Hydroxybenzotriazol und 206 mg (1,0 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid in N-Methyl-2-pyrrolidon. Im Anschluß erfolgt die schrittweise Ankopplung an den polymeren Träger. Nach der letzten Kopplung wird die tert.-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe durch Behandlung mit Trifluoressigsäure entfernt. Die Abspaltung vom Träger erfolgt durch 25-minütige Behandlung mit einer Lösung von 200 µl Trifluotmethansulfonsäure in 2 ml Trifluoressigsäure. Die Reindarstellung erfolgt durch RP-HPLC an C8 mit einem ansteigenden Gradienten von TFA in Acetonitril.
 30 Ausbeute: 27 mg (29 %)

Beispiel 48

40 Festphasensynthese von H-(IT)₇-Gly-OH

120 mg (0,1 mmol) tert.-Butyloxycarbonyl-Glycin-PAM-Resin werden im Reaktionsgefäß vorgelegt. Die tert.-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe wird vor jedem Kopplungsschritt durch Behandlung mit Trifluoressigsäure abgespalten. Die Aktivierung von jeweils 136 mg (0,34 mmol) IBocT erfolgt durch Umsetzung mit 365 mg (2,7 mmol) Hydroxybenzotriazol und 206 mg (1,0 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid in N-Methyl-2-pyrrolidon. Im Anschluß erfolgt die schrittweise Ankopplung an den polymeren Träger. Nach der letzten Kopplung wird die tert.-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe durch Behandlung mit Trifluoressigsäure entfernt. Die Abspaltung vom Träger erfolgt durch 25-minütige Behandlung mit einer Lösung von 200 µl Trifluormethansulfonsäure in 2 ml Trifluoressigsäure. Die Reindarstellung erfolgt durch RP-HPLC an C8 mit einem ansteigenden Gradienten von TFA in Acetonitril.
 45 Ausbeute: 72 mg (36 %)

Beispiel 49**Festphasensynthese von H-(IT)₁₅-Gly-OH**

- 5 120 mg (0,1 mmol) tert.-Butyloxycarbonyl-Glycin-PAM-Resin werden im Reaktionsgefäß vorgelegt. Die
tert.-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe wird vor jedem Kopplungsschritt durch Behandlung mit Trifluoressig-
säure abgespalten. Die Aktivierung von jeweils 136 mg (0,34 mmol) IBocT erfolgt durch Umsetzung mit 365
mg (2,7 mmol) Hydroxybenzotriazol und 206 mg (1,0 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid in N-Methyl-2-
pyrrolidon. Im Anschluß erfolgt die schrittweise Ankopplung an den polymeren Träger. Nach der letzten
10 Kopplung wird die tert.-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe durch Behandlung mit Trifluoressigsäure entfernt.
Die Abspaltung vom Träger erfolgt durch 25-minütige Behandlung mit einer Lösung von 200 µl Trifluorme-
thansulfonsäure in 2 ml Trifluoressigsäure. Die Reindarstellung erfolgt durch RP-HPLC an C8 mit einem
ansteigenden Gradienten von TFA in Acetonitril.
Ausbeute: 80 mg (19 %)
- 15 LDI-MS: 4282 g/mol gefunden, 4279,2 g/mol berechnet
LDI: Laser Desorptionsionisation

Beispiel 50**Festphasensynthese von H-(IC)₂-Gly-OH**

- 20 120 mg (0,1 mmol) tert.-Butyloxycarbonyl-Glycin-PAM-Resin werden im Reaktionsgefäß vorgelegt. Die
tert.-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe wird vor jedem Kopplungsschritt durch Behandlung mit Trifluoressig-
säure abgespalten. Die Aktivierung von jeweils 166 mg (0,34 mmol) IBocC^{Bz} erfolgt durch Umsetzung mit
25 365 mg (2,7 mmol) Hydroxybenzotriazol und 206 mg (1,0 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid in N-Methyl-2-
pyrrolidon. Im Anschluß erfolgt die schrittweise Ankopplung an den polymeren Träger. Nach der letzten
Kopplung wird die tert.-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe durch Behandlung mit Trifluoressigsäure entfernt.
Die Abspaltung vom Träger erfolgt durch 25-minütige Behandlung mit einer Lösung von 200 µl Trifluo-
methansulfonsäure in 2 ml Trifluoressigsäure. Die Abspaltung der Benzoyl-Schutzgruppe erfolgt durch Einwir-
kung von konzentrierter Ammoniak-Lösung bei 55 °C. Die Reindarstellung erfolgt durch RP-HPLC an C8 mit
30 einem ansteigenden Gradienten von TFA in Acetonitril.
Ausbeute: 7 mg (11 %)
- FAB: Fast Atom Bombardment
FAB-MS: 605 g/mol gefunden, 605 g/mol berechnet

35

Beispiel 51**Festphasensynthese von H-(IIT-Ala)₂-OH**

- 40 125 mg (0,1 mmol) tert.-Butyloxycarbonyl-Alanin-PAM-Resin werden im Reaktionsgefäß vorgelegt. Die
tert.-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe wird vor jedem Kopplungsschritt durch Behandlung mit Trifluoressig-
säure abgespalten. Die Aktivierung von jeweils 164 mg (0,5 mmol) IIIBocT und 189 mg (1,0 mmol) tert.-
Butyloxycarbonyl-Alanin erfolgt durch Umsetzung mit 135 mg (1,0 mmol) Hydroxybenzotriazol und 206 mg
45 (1,0 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid in N-Methyl-2-pyrrolidon. Im Anschluß erfolgt die schrittweise Ankopp-
lung an den polymeren Träger. Nach der letzten Kopplung wird die tert.-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe
durch Behandlung mit Trifluoressigsäure entfernt. Die Abspaltung vom Träger erfolgt durch 25-minütige
Behandlung mit einer Lösung von 200 µl Trifluormethansulfonsäure in 2 ml Trifluoressigsäure. Die
Reindarstellung erfolgt durch RP-HPLC an C8 mit einem ansteigenden Gradienten von TFA in Acetonitril.
Ausbeute: 34 mg (59 %)
- 50 FAB-MS: 578 g/mol gefunden, 578,6 g/mol berechnet

Beispiel 52**Festphasensynthese von H-(IIT-Ala)₂-OH**

- 55 192 mg (0,1 mmol) N-Fluorenylmethoxycarbonyl-Alanin-HMP-Resin werden im Reaktionsgefäß vorge-
legt. Die N-Fluorenylmethoxycarbonyl-Schutzgruppe wird vor jedem Kopplungsschritt durch Behandlung mit
legt. Die N-Fluorenylmethoxycarbonyl-Schutzgruppe wird vor jedem Kopplungsschritt durch Behandlung mit
311 mg (1,0 mmol) N-Piperidin abgespalten. Die Aktivierung von jeweils 218 mg (0,5 mmol) IIFmocT und 311 mg (1,0 mmol) N-

(1,0 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid in N-Methyl-2-pyrrolidon. Im Anschluß erfolgt die schrittweise Ankopplung an den polymeren Träger. Nach der letzten Kopplung wird die tert.-ButyloxycarbonylSchutzgruppe durch Behandlung mit Trifluoressigsäure entfernt. Die Abspaltung vom Träger erfolgt durch 60 minütige Behandlung mit einer Lösung von 0,5 ml Anisol in 4,5 ml HF bei 0 °C. Die Reindarstellung erfolgt durch RP-HPLC an C8 mit einem ansteigenden Gradienten von TFA in Acetonitril.

Ausbeute: 42 mg (76 %)

FAB-MS: 548 g/mol gefunden, 549,0 g/mol berechnet

Beispiel 60

10 Festphasensynthese von H-IVT-IVC-Ala-OH

125 mg (0,1 mmol) tert.-Butyloxycarbonyl-Alanin-PAM-Resin werden im Reaktionsgefäß vorgelegt. Die tert.-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe wird vor jedem Kopplungsschritt durch Behandlung mit Trifluoressigsäure abgespalten. Die Aktivierung von jeweils 198 mg (0,5 mmol) IVBocT und 243 mg (0,5 mmol) IVBocC^{Bz} erfolgt durch Umsetzung mit 135 mg (1,0 mmol) Hydroxybenzotriazol und 206 mg (1,0 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid in N-Methyl-2-pyrrolidon. Im Anschluß erfolgt die schrittweise Ankopplung an den polymeren Träger. Nach der letzten Kopplung wird die tert.-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe durch Behandlung mit Trifluoressigsäure entfernt. Die Abspaltung vom Träger erfolgt durch 8-stündige Behandlung mit einer Lösung von 0,5 ml Anisol in 4,5 ml HF bei 0 °C. Die Reindarstellung erfolgt durch RP-HPLC an C8 mit einem ansteigenden Gradienten von TFA in Acetonitril.

Ausbeute: 54 mg (86 %)

ESI-MS: 630 g/mol gefunden, 630,6 g/mol berechnet

ESI: Electron Spray Ionisation

25 **Beispiel 61**

Festphasensynthese von H-Lys-(IVT)₈-Ala-OH

30 125 mg (0,1 mmol) tert.-Butyloxycarbonyl-Alanin-PAM-Resin werden im Reaktionsgefäß vorgelegt. Die tert.-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe wird vor jedem, Kopplungsschritt durch Behandlung mit Trifluoressigsäure abgespalten. Die Aktivierung von jeweils 198 mg (0,5 mmol) IVBocT und 415mg (1,0 mmol) tert.-Butyloxycarbonyl-2-chlorbenzyloxycarbonyl-Lysin erfolgt durch Umsetzung mit 135 mg (1,0 mmol) Hydroxybenzotriazol und 206 mg (1,0 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid in N-Methyl-2-pyrrolidon. Im Anschluß erfolgt die schrittweise Ankopplung an den polymeren Träger. Nach der letzten Kopplung wird die tert.-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe durch Behandlung mit Trifluoressigsäure entfernt. Die Abspaltung vom Träger erfolgt durch 60 minütige Behandlung mit einer Lösung von 0,5 ml Anisol in 4,5 ml HF bei 0 °C. Die Reindarstellung erfolgt durch RP-HPLC an C8 mit einem ansteigenden Gradienten von TFA in Acetonitril.

Ausbeute: 180 mg (74 %)

40 ESI-MS: 2442 g/mol gefunden, 2443,3 g/mol berechnet

Beispiel 62

Festphasensynthese von H-Lys-IVT-IVC-IVT-IVC-IVC-IVT-IVC-IVT-Ala-OH

45 125 mg (0,1 mmol) tert.-Butyloxycarbonyl-Alanin-PAM-Resin werden im Reaktionsgefäß vorgelegt. Die tert.-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe wird vor jedem Kopplungsschritt durch Behandlung mit Trifluoressigsäure abgespalten. Die Aktivierung von jeweils 198 mg (0,5 mmol) IVBocT, 243 mg (0,5 mmol) IVBocC^{Bz} und 415 mg (1,0 mmol) tert.-Butyloxycarbonyl-2-chlorbenzyloxycarbonyl-Lysin erfolgt durch Umsetzung mit 135 mg (1,0 mmol) Hydroxybenzotriazol und 206 mg (1,0 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid in N-Methyl-2-pyrrolidon. Im Anschluß erfolgt die schrittweise Ankopplung an den polymeren Träger. Nach der letzten Kopplung wird die tert.-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe durch Behandlung mit Trifluoressigsäure entfernt. Die Abspaltung vom Träger erfolgt durch 8 stündige Behandlung mit einer Lösung von 0,5 ml Anisol in 4,5 ml HF bei 0 °C. Die Reindarstellung erfolgt durch RP-HPLC an C8 mit einem ansteigenden Gradienten von TFA in Acetonitril.

Ausbeute: 83 mg (35 %)

LDI-MS: 2382 g/mol gefunden, 2383,3 g/mol berechnet

Beispiel 63**Festphasensynthese von H-Lys-(VT)₈-Ala-OH**

- 5 125 mg (0,1 mmol) tert.-Butyloxycarbonyl-Alanin-PAM-Resin werden im Reaktionsgefäß vorgelegt. Die
tert.-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe wird vor jedem Kopplungsschritt durch Behandlung mit Trifluoressig-
säure abgespalten. Die Aktivierung von jeweils 115 mg (0,3 mmol) VBocT und 415 mg (1,0 mmol) tert.-
Butyloxycarbonyl-2-chlorbenzylloxycarbonyl-Lysin erfolgt durch Umsetzung mit 135 mg (1,0 mmol) Hy-
droxybenzotriazol und 206 mg (1,0 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid in N-Methyl-2-pyrrolidon. Im Anschluß
10 erfolgt die schrittweise Ankopplung an den polymeren Träger. Nach der letzten Kopplung wird die tert.-
Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe durch Behandlung mit Trifluoressigsäure entfernt. Die Abspaltung vom
Träger erfolgt durch 60 minütige Behandlung mit einer Lösung von 0,5 ml Anisol in 4,5 ml HF bei 0 °C. Die
Reindarstellung erfolgt durch RP-HPLC an C8 mit einem ansteigenden Gradienten von TFA in Acetonitril.
Ausbeute: 83 mg (35 %)
- 15 LDI-MS: 2347,4 g/mol gefunden, 2347,3 g/mol berechnet

Nachweis von DNA-Einzelstrangbindung durch Gel-shift-Analysen**Beispiel 64**

- 20 1 µg Oligonukleotid von entsprechender Basensequenz wird mit Polynukleotidkinase und γ -ATP am 5'-
Ende in bekannter Weise in einem Volumen von 10 µl markiert (Sambrook, Fritsch, Maniatis: Molecular
Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, 1989). Nach der Markierung wird die Probe zur
Denaturierung des Enzyms bei 70 °C für 10 min erhitzt und anschließend mit 9 µg nicht markiertem
25 Oligomer vermischt. 1 µl dieses Ansatzes wird mit einer gewünschten Menge zu testendem Nukleinsäure-
bindenden Oligomer versetzt (1-10 µg) und in einem Volumen von 20 µl 30 min bei 22 °C (Raumtempera-
tur) inkubiert (Hybridisierung). Danach wird die Probe 30 min auf Eis gestellt. Ein nicht hybridisiertes
markiertes Oligomer wird in gleicher Weise behandelt und dient als Kontrolle. Die Proben werden auf ein 15
30 % Polyacrylamidgel mit 1x Tris-Borat-EDTA-Puffer aufgetragen. Das Gel und der Puffer wurden im
Kühlschrank (8 °C) vorgekühlt, die Elektrophorese wurde über Nacht mit 55 V im Kühlschrank laufen
gelassen. Nach der Elektrophorese wurde ein Autoradiogramm auf AGFA-Film erstellt (Exponierzeiten 1 bis
16 Stunden).

Nachweis der Strangverdrängung in doppelsträngiger Plasmid-DNA durch Nukleinsäurenbindende**Oligomere****Beispiel 65**

- 35 Die Tests werden wie folgt durchgeführt:
40 (Die im Beispiel eingesetzte Plasmid-DNA ist nur ein Modell-Substrat im Test. Andere Plasmide, die Poly-
Adenin Sequenzbereiche mit definierten Abständen zueinander enthalten, sind ebenfalls verwendbar.)
Adenin Sequenzbereiche mit definierten Abständen zueinander enthalten, sind ebenfalls verwendbar.)
Doppelsträngige, zirkuläre Plasmid-DNA von 4880 Basenpaaren Länge, die zwei Poly-Adenin Sequenz-
bereiche mit mindestens neun aufeinander folgenden Adeninnukleotiden im Abstand von 1150 Basenpaaren
enthält, wird in den hier beschriebenen Tests verwendet.
- 45 Sechs parallel angesetzte Proben (bezeichnet 1-6) enthielten je 1,0 µg ungeschnittene Plasmid-DNA in
14 µl H₂O. Den Proben 3 bis 6 wurden je 1 µl Lösung von 0,01 µg, 0,1 µg, 1,0 µg und 2,0 µg
Nukleinsäuren-bindendes Oligomer zugesetzt und in geschlossenen Eppendorfreaktionsgefäß 45 Minuten
bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden in alle Proben 4 µl Puffer (250 mM Na-Aacetat, 1M NaCl, 2,5 %
Glycerin, 5 mM ZnCl₂, pH 4,4), und in die Proben 2 bis 6 je 1 µl S1-Nuclease (*Aspergillus oryzae*, Fa.
Boehringer-Mannheim) mit einer Aktivität von 10 U/µl gegeben.
- 50 Nach einer Inkubation von 15 Minuten bei 30 °C wurden die Proben auf Eis gesetzt, 1 µl 0,5 M EDTA
und 3 µl Auftragspuffer (50 % Glycerin, 0,25 % Bromphenolblau in 40 mM Tris-HCl, 20 mM Na-Aacetat, 1
mM EDTA, pH: 7,2) zugegeben und ohne Zeitverzug die Proben über 1,2 %-Agarosegele elektrophoretisch
aufgetrennt und nach Anfärbung mit Ethidiumbromid die Größe der entstandenen Plasmid-Fragmente im
55 Gel im Vergleich zu einem Molekulargewichtsstandard (1-kb Leiter, Fa. Gibco-BRL, D-7514 Eggenstein) auf
dem Transilluminator (264 nm UV-Licht) bestimmt.
Es zeigte sich, daß in den Proben mit einer Konzentration > 0,1 µg Oligomer (Proben 5 und 6) DNA-
Fragmente von 4880 Basenpaaren (Plasmid-Linearisierung), und 3730 sowie 1150 Basenpaaren (sequenz-

Fluorenylmethoxycarbonyl-Alanin erfolgt durch Umsetzung mit 135 mg (1,0 mmol) Hydroxybenzotriazol und 206 mg (1,0 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid in N-Methyl-2-pyrrolidon. Im Anschluß erfolgt die schrittweise Ankopplung an den polymeren Träger. Nach der letzten Kopplung wird die N-Fluorenylmethoxycarbonyl-Schutzgruppe durch Behandlung mit Piperidin entfernt. Die Abspaltung vom Träger erfolgt durch 60-minütige Behandlung mit Trifluoressigsäure. Die Reindarstellung erfolgt durch RP-HPLC an C8 mit einem ansteigenden Gradienten von TFA in Acetonitril.

Ausbeute: 27 mg (47 %)

Beispiel 53

10 Festphasensynthese von H-(IIC-Ala)₂-OH

125 mg (0,1 mmol) tert.-Butyloxycarbonyl-Alanin-PAM-Resin werden im Reaktionsgefäß vorgelegt. Die tert.-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe wird vor jedem Kopplungsschritt durch Behandlung mit Trifluoressigsäure abgespalten. Die Aktivierung von jeweils 213 mg (0,5 mmol) II^{Bz}Boc und 189 mg (1,0 mmol) tert.-Butyloxycarbonyl-Alanin erfolgt durch Umsetzung mit 135 mg (1,0 mmol) Hydroxybenzotriazol und 206 mg (1,0 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid in N-Methyl-2-pyrrolidon. Im Anschluß erfolgt die schrittweise Ankopplung an den polymeren Träger. Nach der letzten Kopplung wird die tert.-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe durch Behandlung mit Trifluoressigsäure entfernt. Die Abspaltung vom Träger erfolgt durch 25-minütige Behandlung mit einer Lösung von 200 µl Trifluormethansulfonsäure in 2 ml Trifluoressigsäure. Die Abspaltung der Benzoyl-Schutzgruppe erfolgt durch Einwirkung von 0,4 M wässriger/methanolischer Natronlauge für 16 Stunden bei Raumtemperatur. Die Reindarstellung erfolgt durch RP-HPLC an C8 mit einem ansteigenden Gradienten von TFA in Acetonitril.

Ausbeute: 14 mg (26 %)

25 FAB-MS: 548 g/mol gefunden, 548,5 g/mol berechnet

Beispiel 54

Festphasensynthese von H-IIT-Ala-(IIT-Gly)₆-IIT-Ala-OH

30 125 mg (0,1 mmol) tert.-Butyloxycarbonyl-Alanin-PAM-Resin werden im Reaktionsgefäß vorgelegt. Die tert.-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe wird vor jedem Kopplungsschritt durch Behandlung mit Trifluoressigsäure abgespalten. Die Aktivierung von jeweils 213 mg (0,5 mmol) II^TBocT, 189 mg (1,0 mmol) tert.-Butyloxycarbonyl-Alanin und 175 mg (1,0 mmol) tert.-Butyloxycarbonyl-Glycin erfolgt durch Umsetzung mit 135 mg (1,0 mmol) Hydroxybenzotriazol und 206 mg (1,0 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid in N-Methyl-2-pyrrolidon. Im Anschluß erfolgt die schrittweise Ankopplung an den polymeren Träger. Nach der letzten Kopplung wird die tert.-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe durch Behandlung mit Trifluoressigsäure entfernt. Die Abspaltung vom Träger erfolgt durch 25-minütige Behandlung mit einer Lösung von 200 µl Trifluormethansulfonsäure in 2 ml Trifluoressigsäure. Die Reindarstellung erfolgt durch RP-HPLC an C8 mit einem ansteigenden Gradienten von TFA in Acetonitril.

Ausbeute: 27 mg (12 %)

40 LDI-MS: 2178 g/mol gefunden, 2176,1 g/mol berechnet

Beispiel 55

45 Festphasensynthese von H-(IIT-Gly-IIT-Asp)₄-OH

135 mg (0,1 mmol) N-Fluorenylmethoxycarbonyl-Asparaginsäure-tert.-Butylester-HMP-Resin werden im Reaktionsgefäß vorgelegt. Die N-Fluorenylmethoxycarbonyl-Schutzgruppe wird vor jedem Kopplungsschritt durch Behandlung mit Piperidin abgespalten. Die Aktivierung von jeweils 100 mg (0,2 mmol) II^{Fmoc}T, 297 mg (1,0 mmol) N-Fluorenylmethoxycarbonyl-Glycin und 411 mg (1,0 mmol) N-Fluorenylmethoxycarbonyl-Asparaginsäure-tert.-butylester erfolgt durch Umsetzung mit 135 mg (1,0 mmol) Hydroxybenzotriazol und 206 mg (1,0 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid in N-Methyl-2-pyrrolidon. Im Anschluß erfolgt die schrittweise Ankopplung an den polymeren Träger. Nach der letzten Kopplung wird die N-Fluorenylmethoxycarbonyl-Schutzgruppe durch Behandlung mit Piperidin entfernt. Die Abspaltung vom Träger erfolgt durch 60-minütige Behandlung mit Trifluoressigsäure. Die Reindarstellung erfolgt durch RP-HPLC an C8 mit einem ansteigenden Gradienten von TFA in Acetonitril.

Ausbeute: 57 mg (24 %)

LDI-MS: 2379 g/mol gefunden, 2380,2 g/mol berechnet

Beispiel 56

5 Festphasensynthese von H-Gly-IIIT-Ala-OH

125 mg (0,1 mmol) tert.-Butyloxycarbonyl-Alanin-PAM-Resin werden im Reaktionsgefäß vorgelegt. Die
tert.-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe wird vor jedem Kopplungsschritt durch Behandlung mit Trifluoressig-
säure abgespalten. Die Aktivierung von jeweils 169 mg (0,5 mmol) IIIBocT und 175 mg (1,0 mmol) tert.-
Butyloxycarbonyl-Glycin erfolgt durch Umsetzung mit 135 mg (1,0 mmol) Hydroxybenzotriazol und 206 mg
Dicyclohexylcarbodiimid in N-Methyl-2-pyrrolidon. Im Anschluß erfolgt die schrittweise Ankopp-
(1,0 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid in N-Methyl-2-pyrrolidon. Nach der letzten Kopplung wird die tert.-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe
lung an den polymeren Träger. Nach der letzten Kopplung wird die tert.-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe
durch Behandlung mit Trifluoressigsäure entfernt. Die Abspaltung vom Träger erfolgt durch 60-minütige
Behandlung mit einer Lösung von 0,5 ml Anisol in 4,5 ml HF bei 0 °C. Die Reindarstellung erfolgt durch RP-
HPLC an C8 mit einem ansteigenden Gradienten von TFA in Acetonitril.
Ausbeute: 15 mg (41 %)
FAB-MS: 367 g/mol gefunden, 367,4 g/mol berechnet

Beispiel 57

20 Festphasensynthese von H-IIIT-Gly-IIIT-Ala-OH

125 mg (0,1 mmol) tert.-Butyloxycarbonyl-Alanin-PAM-Resin werden im Reaktionsgefäß vorgelegt. Die
tert.-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe wird vor jedem Kopplungsschritt durch Behandlung mit Trifluoressig-
säure abgespalten. Die Aktivierung von jeweils 169 mg (0,5 mmol) IIIBocT und 175 mg (1,0 mmol) tert.-
Butyloxycarbonyl-Glycin erfolgt durch Umsetzung mit 135 mg (1,0 mmol) Hydroxybenzotriazol und 206 mg
Dicyclohexylcarbodiimid in N-Methyl-2-pyrrolidon. Im Anschluß erfolgt die schrittweise Ankopp-
(1,0 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid in N-Methyl-2-pyrrolidon. Nach der letzten Kopplung wird die tert.-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe
lung an den polymeren Träger. Nach der letzten Kopplung wird die tert.-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe
durch Behandlung mit Trifluoressigsäure entfernt. Die Abspaltung vom Träger erfolgt durch 60-minütige
Behandlung mit einer Lösung von 0,5 ml Anisol in 4,5 ml HF bei 0 °C. Die Reindarstellung erfolgt durch RP-
HPLC an C8 mit einem ansteigenden Gradienten von TFA in Acetonitril.
Ausbeute: 25 mg (43 %)
FAB-MS: 588 g/mol gefunden, 588,6 g/mol berechnet

35 **Beispiel 58**

Festphasensynthese von H-(IVC)₂-Ala-OH

125 mg (0,1 mmol) tert.-Butyloxycarbonyl-Alanin-PAM-Resin werden im Reaktionsgefäß vorgelegt. Die
tert.-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe wird vor jedem Kopplungsschritt durch Behandlung mit Trifluoressig-
säure abgespalten. Die Aktivierung von jeweils 243 mg (0,5 mmol) IVBocC^{Bz} erfolgt durch Umsetzung mit
135 mg (1,0 mmol) Hydroxybenzotriazol und 206 mg (1,0 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid in N-Methyl-2-
pyrrolidon. Im Anschluß erfolgt die schrittweise Ankopplung an den polymeren Träger. Nach der letzten
Kopplung wird die tert.-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe durch Behandlung mit Trifluoressigsäure entfernt.
Die Abspaltung vom Träger erfolgt durch 8-stündige Behandlung mit einer Lösung von 0,5 ml Anisol in 4,5
ml HF bei 0 °C. Die Reindarstellung erfolgt durch RP-HPLC an C8 mit einem ansteigenden Gradienten von
TFA in Acetonitril.
Ausbeute: 33 mg (53 %)
FAB-MS: 616 g/mol gefunden, 617 g/mol berechnet

50 **Beispiel 59**

Festphasensynthese von H-(IIC-Ala)₂-OH

125 mg (0,1 mmol) tert.-Butyloxycarbonyl-Alanin-PAM-Resin werden im Reaktionsgefäß vorgelegt. Die
tert.-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe wird vor jedem Kopplungsschritt durch Behandlung mit Trifluoressig-
säure abgespalten. Die Aktivierung von jeweils 446 mg (1,0 mmol) IIIBocC^{Bz} und 139 mg (1,0 mmol) tert.-
Butyloxycarbonyl-Alanin erfolgt durch Umsetzung mit 135 mg (1,0 mmol) Hydroxybenzotriazol und 206 mg

selektive Fragmentierung) sichtbar waren.

Mit einem modifizierten Testansatz, bei dem in die Proben anstelle der zirkulären Plasmid-DNA eine Plasmid-DNA gegeben wurde, die durch Restriktionsendonukleaseverdau in unmittelbarer Nachbarschaft zu einer der beiden Poly-Adenin Sequenzbereiche linearisiert war, waren ebenfalls in den Proben 5 und 6 die DNA-Fragmente von 3730 und 1150 Basenpaaren Länge nachweisbar.

Mit diesen Testreihen war die konzentrationsabhängige und sequenzselektive Bindung von Nukleinsäuren-bindenden Oligomeren an doppelsträngige DNA und der Nachweis der dadurch entstehenden Einzelstrang-DNA durch S1-Nukleaseverdauung bei hohen Salzkonzentrationen (einzelstrangspezifische Aktivität von S1-Nuklease) nachweisbar.

10 Proteinsynthesehemmung in in vitro Translationstesten durch Nukleinsäurebindende Oligomere

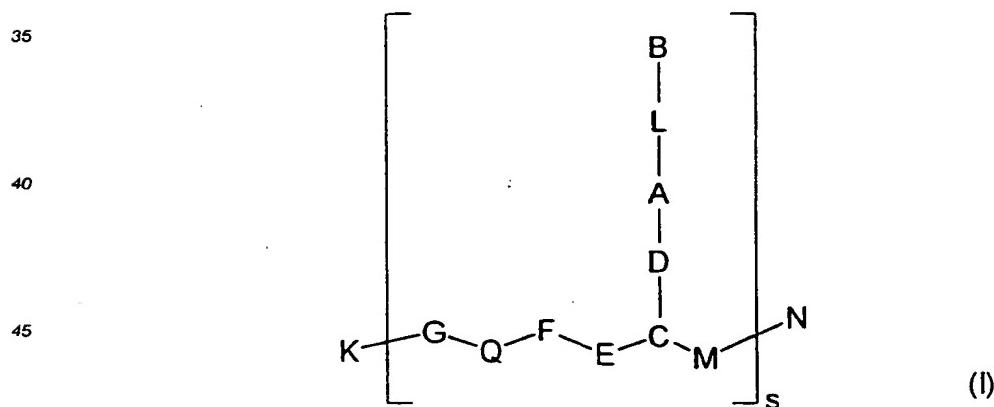
Beispiel 66

15 Zur in vitro Translation wurde ein Kaninchenretikulozytenlysat der Fa. Promega, Madison, Wisconsin verwendet, sowie in vitro transkribierte mRNA des tat-Gens aus HIV-I und der Delta-Untereinheit des Acetylcholinrezeptors aus Torpedo californica. Andere Gene können in gleicher Weise verwendet werden. Die cDNA-Konstrukte der Gene wurden mit SP6- bzw. T7-RNA-Polymerase in gängiger Weise transkribiert (Sambrook et al., dito), das DNA-Plasmid wurde anschließend durch DNase verdaut, die mRNA phenolisiert 20 und dreimal mit Ethanol gefällt. 1 bis 2 µg der erhaltenen mRNA wurde in Gegenwart von 35 S-markiertem Cystein zur in vitro Translation eingesetzt. Die Analyse des gebildeten radioaktiven Proteins erfolgte auf einem 6 bis 18 % bzw. 6 bis 10 % diskontinuierlichen SDS-PAGE nach Laemmli, U.K. (1970) Nature 227, 680-685.

Zur quantitativen Messung der Translationsinhibition durch Nukleinsäure-bindende Oligomere wurde zur 25 mRNA eine gewünschte Menge Oligomer (0,01 bis 2 µg) hinzugegeben und dann wie oben beschrieben in Kaninchenretikulozytenlysat die in vitro Translation durchgeführt. Autoradiographien von SDS-Polyacrylamidelektrophoresegeleben der Testansätze wurden mit einem Scanner quantitativ ausgewertet.

Patentansprüche

30 **1. Verbindungen der allgemeinen Formel (I)**



50 in der

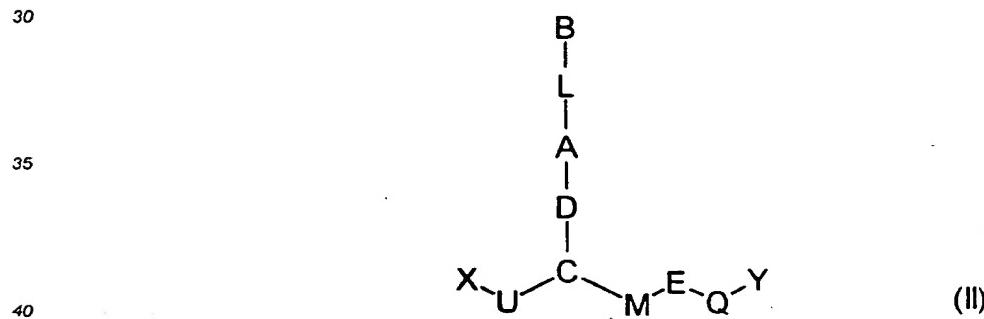
- A für -CO-, -CHR-, -CRR'- steht,
- B unabhängig voneinander ausgewählt wird aus einer Gruppe, bestehend aus:
-H, -OH, (C_1-C_4)-Alkanoyl, DNA-Interkalatoren, aromatischen Resten, heterocyclischen Resten, natürlich vorkommenden Nukleobasen wie Thymin, Uracil, Cytosin, Adenin, Guanin, Hypoxanthin, Inosin oder durch chemische Modifikation von diesen abgeleitete Derivate sowie halogenierten Vorstufen dieser Nukleobasen, sowie geschützte Derivate der Nukleobasen mit den in der Nukleotid- oder Peptidchemie üblichen Schutzgruppen,

- C für -CH-, -CR- steht, wobei C einheitlich S oder R konfiguriert sein kann.
 D für -NH-, -CH₂-, -CHR-, -CRR'- steht.
 E für -NH-, -NR-, -CHR-, -CRR'-, -O-, -S- steht.
- A und E miteinander über eine Alkylkette $[-(\text{CH}_2)_n-]$, mit n = 0, 1, 2] verbunden sein können.
- F für -CH₂-, -CO-, -SO₂, -SO-, -CS- steht,
 Q für $(-\text{CR}'\text{R}^2)_m$ mit m = 0, 1, 2 und R¹, R² unabhängig voneinander ausgewählt aus einer Gruppe bestehend aus Resten von natürlichen oder unnatürlichen Aminosäuren wie z.B. aus: Glycin, Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Serin, Threonin, Cystein, Methionin, Phenylalanin, Thyrosin, Histidin, Tryptophan, Lysin, Ornithin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Asparagin, Glutamin, Arginin, Prolin, Hydroxyprolin, Sarcosin, Aminoisobuttersäure, Dehydroaminoäuren wie z.B. Dehydroalanin, Dehydro- α -aminobuttersäure, andere unnatürliche Aminosäuren wie Phenylglycin, 4-Nitrophenylalanin, 3-Nitrophenylalanin, 2-Nitrophenylalanin, 2-, 3- oder 4-Aminophenylalanin, 3,4-Dichlorphenylalanin, 4-Jodphenylalanin, 4-Methoxyphenylalanin, 1-Triazolylalanin, 2-Pyridylalanin, 3-Pyridylalanin, 4-Pyridylalanin, 1-Naphthylalanin oder 2-Naphthylalanin, gegebenenfalls mit Schutzgruppen, stereochemisch einheitlich in der L-Form oder der D-Form steht,
- G und Q miteinander über eine Alkylkette $[(-\text{CH}_2)_n]$ mit n = 0, 1, 2] verbunden sein können
- G für -NH-, -NR-, -O-, -S- steht,
 M für -CH₂-, -CO-, -SO₂-, -SO-, -CS- steht,
 L für $(\text{CH}_2)_p$ mit p = 0, 1, 2, -CHR-, -CRR'- steht,
 K für Carrier-System, Reporter-Ligand, H, löslichkeitsvermittelnde Gruppe steht,
 N für Carrier-System, Reporter-Ligand, OH, löslichkeitsvermittelnde Gruppe steht,
 s für einen Wert von 1 bis 30 steht und
- R und R' für H, OH, Alkyl, Aralkyl oder Aryl stehen.
- 2. Verbindungen der allgemeinen Formel (I) gemäß Anspruch 1, in der**
- A für -CO-, -CHR-, -CRR'- steht,
 B unabhängig voneinander ausgewählt wird aus einer Gruppe, bestehend aus: -H, -OH, (C₁-C₄)-Alkanoyl, DNA-Interkalatoren, aromatischen Resten, heterocyclischen Resten, natürlich vorkommenden Nukleobasen wie Thymin, Uracil, Cytosin, Adenin, Guanin, Hypoxanthin, Inosin sowie halogenierten Vorstufen dieser Nukleobasen, sowie geschützte Derivate der Nukleobasen mit den in der Nukleotid- oder Peptidchemie üblichen Schutzgruppen,
 C für -CH-, -CR- steht, wobei C einheitlich S oder R konfiguriert sein kann,
 D für -NH-, -CH₂-, -CHR-, -CRR'- steht,
 E für -NR-, -NH-, -CHR-, -CRR'-, -O- steht,
- A und E miteinander über eine Alkylkette $[-(\text{CH}_2)_n-]$, mit n = 0, 1, 2] verbunden sein können,
- F für -CH₂-, -CO-, SO₂-, -SO-, -CS- steht,
 Q für $(-\text{CR}'\text{R}^2)_m$, mit m = 0, 1, 2 und R¹, R² unabhängig voneinander ausgewählt aus einer Gruppe bestehend aus Resten von natürlichen oder unnatürlichen Aminosäuren wie z.B. aus: Glycin, Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Serin, Threonin, Cystein, Methionin, Phenylalanin, Thyrosin, Histidin, Tryptophan, Lysin, Ornithin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Asparagin, Glutamin, Arginin, Prolin, Hydroxyprolin, Sarcosin, Aminoisobuttersäure, Dehydroaminoäuren wie z.B. Dehydroalanin, Dehydro- α -aminobuttersäure, andere unnatürliche Aminosäuren wie Phenylglycin, 4-Nitrophenylalanin, 3-Nitrophenylalanin, 2-Nitrophenylalanin, 1-Naphthylalanin oder 2-Naphthylalanin, gegebenenfalls mit Schutzgruppen, stereochemisch einheitlich in der L- oder D-Form steht,
- G und Q miteinander über eine Alkylkette $[(-\text{CH}_2)_n]$ mit n = 0, 1, 2] verbunden sein können
- G für -NH-, -NR-, -O- steht,
 M für -CH₂-, -CO-, -SO₂-, -CS- steht,
 L für $(\text{CH}_2)_p$ mit p = 0, 1, 2, -CHR-, -CRR'- steht,
 K für Carrier-System, Reporter-Ligand, H, löslichkeitsvermittelnde Gruppe steht,
 N für Carrier-System, Reporter-Ligand, OH, löslichkeitsvermittelnde Gruppe steht,
 s für einen Wert von 1 bis 30 steht,
- R und R' für H, OH, Alkyl, Aralkyl oder Aryl stehen.
- 3. Verbindungen der allgemeinen Formel (I) gemäß Anspruch 1, in der**
- A für -CO-, -CHR-, -CRR'- steht,
 B unabhängig voneinander ausgewählt wird aus einer Gruppe, bestehend aus:

-H, -OH, (C_1-C_4)-Alkanoyl, DNA-Interkalatoren, aromatischen Resten, heterocyclischen Resten, natürlich vorkommenden Nukleobasen wie Thymin, Uracil, Cytosin, Adenin, Guanin, Hypoxanthin, Inosin sowie halogenierten Vorstufen dieser Nukleobasen, sowie geschützte Derivate der Nukleobasen mit den in der Nukleotid- oder Peptidchemie üblichen Schutzgruppen,

5 C für -CH-, -CR- steht, wobei C einheitlich S oder R konfiguriert sein kann,
 D für -NH-, -CH₂-, -CHR-, -CRR'- steht,
 E für -NR-, -NH-, -CHR- steht,
 A und E miteinander über eine Alkylkette $[-(CH_2)_n]$, mit n = 0, 1, 2] verbunden sein können,
 F für -CH₂-, -CO-, -CS- steht,
 10 Q für $(-CR^1R^2)_m$ mit m = 0, 1, 2 und R¹, R² unabhängig voneinander ausgewählt aus einer Gruppe bestehend aus Resten von natürlichen oder unnatürlichen Aminosäuren wie z.B. aus: Glycin, Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Serin, Threonin, Cystein, Methionin, Phenylalanin, Thyrosin, Histidin, Tryptophan, Lysin, Ornithin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Asparagin, Glutamin, Arginin, Prolin, Hydroxyprolin, Sarcosin, Aminoisobuttersäure, Dehydroaminozäuren
 15 wie z.B. Dehydroalanin, Dehydro- α -aminobuttersäure, andere unnatürliche Aminosäuren wie Phenylglycin, gegebenenfalls mit Schutzgruppen, stereochemisch einheitlich in der L-Form oder der D-Form steht,
 G und Q miteinander über eine Alkylkette $[(-CH_2)_n$ mit n = 0, 1, 2] verbunden sein können
 G für -NH-, -NR-, -O- steht,
 20 M für -CH₂-, -CO-, -CS- steht,
 L für $(CH_2)_p$ mit p = 0, 1, 2, -CHR-, -CRR'- steht,
 K für Carrier-System, Reporter-Ligand, H, löslichkeitsvermittelnde Gruppe steht,
 N für Carrier-System, Reporter-Ligand, OH, löslichkeitsvermittelnde Gruppe steht,
 S für einen Wert von 1 bis 30 steht,
 25 H und R' für H, OH, Alkyl, Aralkyl oder Aryl stehen.

4. Verbindungen der allgemeinen Formel (II)



in der

45 A für -CO-, -CHR-, -CRR'- steht,
 B unabhängig voneinander gewählt wird aus einer Gruppe, bestehend aus: -H, -OH, (C_1-C_4)-Alkanoyl, DNA-Interkalatoren, aromatischen Resten, heterocyclischen Resten, natürlich vorkommenden Nukleobasen wie Thymin, Uracil, Cytosin, Adenin, Guanin, Hypoxanthin, Inosin oder durch chemische Modifikation von diesen abgeleiteten Derivaten, sowie halogenierten Vorstufen dieser Nukleobasen, sowie geschützte Derivate dieser Nukleobasen mit den in der Nukleotid- oder Peptidchemie üblichen Schutzgruppen,

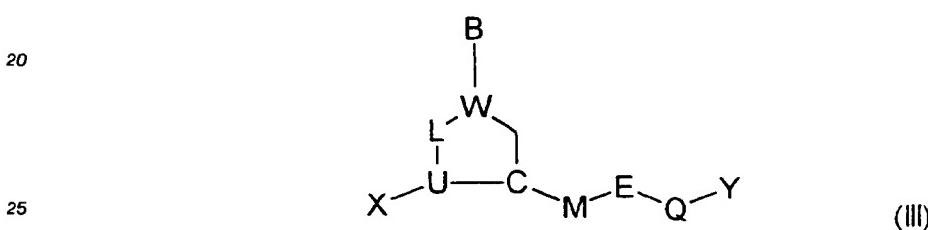
50 C für -CH-, -CR- steht, wobei C einheitlich S oder R konfiguriert sein kann,
 D für -NH-, -CH₂-, -CHR-, -CRR'- steht,
 E für -NH-, -NR-, -CHR-, -CRR'-, -O-, -S- steht,
 Q für $(-CR^1R^2)_m$ mit m = 0, 1, 2 und R¹, R² unabhängig voneinander ausgewählt aus einer Gruppe bestehend aus Resten von natürlichen oder unnatürlichen Aminosäuren wie z.B. aus: Glycin, Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Serin, Threonin, Cystein, Methionin, Phenylalanin, Thyrosin, Histidin, Tryptophan, Lysin, Ornithin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Asparagin, Glutamin, Arginin, Prolin, Hydroxyprolin, Sarcosin, Aminoisobuttersäure, Dehydroaminozäuren
 55

- wie z.B. Dehydroalanin, Dehydro- α -aminobuttersäure, andere unnatürliche Aminosäuren wie Phenylglycin, 4-Nitrophenylalanin, 3-Nitrophenylalanin, 2-Nitrophenylalanin, 2-, 3- oder 4-Amino-phenylalanin, 3,4-Dichlorphenylalanin, 4-Jodphenylalanin, 4-Methoxyphenylalanin, 1-Triazophenylalanin, 2-Pyridylalanin, 3-Pyridylalanin, 4-Pyridylalanin, 1-Naphthylalanin oder 2-Naphthylalanylalanin, 2-Pyridylalanin, 3-Pyridylalanin, 4-Pyridylalanin, 1-Naphthylalanin oder 2-Naphthylalanin, gegebenenfalls mit Schutzgruppen, stereochemisch einheitlich in der L-Form oder der D-Form steht,
- E und Q miteinander über eine Alkylkette [(-CH₂)_n mit n = 0, 1, 2] verbunden sein können
- M für -CH₂-, -CO-, -SO₂-, -SO-, -CS- steht,
L für (CH₂)_p mit p = 0, 1, 2, -CHR-, -CRR'- steht,
U für -NH-, -NR- steht,
X für eine beliebige aus der Peptidchemie bekannte Schutzgruppe, H oder eine beliebige natürliche oder unnatürliche Aminosäure in geschützter oder ungeschützter Form steht und
Y für COOH, CSOH, CH₂OH, COOR" mit R" = beliebige Schutzgruppe aus der Peptidchemie, Carrier, Reporter-Ligand, löslichkeitsvermittelnde Gruppe steht,
- R und R' für H, OH, Alkyl, Aralkyl oder Aryl stehen.
5. Verbindungen der Formel (II) gemäß Anspruch 4, in der
- A für -CO-, -CHR-, -CRR'- steht,
B unabhängig voneinander gewählt wird aus einer Gruppe, bestehend aus: -H, -OH, (C₁-C₄)-Alkanoyl, DNA-Interkalatoren, aromatischen Resten, heterocyclischen Resten, natürlich vorkommenden Nukleobasen wie Thymin, Uracil, Cytosin, Adenin, Guanin, Hypoxanthin, Inosin sowie halogenierten Vorstufen dieser Nukleobasen, sowie geschützte Derivate dieser Nukleobasen mit den in der Nukleotid- oder Peptidchemie üblichen Schutzgruppen,
- C für -CH-, -CR- steht, wobei C einheitlich S oder R konfiguriert sein kann,
D für -NH-, -CH₂-, -CHR-, -CRR'- steht,
E für -NR-, -NH-, -CHR-, -CRR'-, -O- steht,
Q für (-CR¹R²)_m mit m = 0, 1, 2 und R¹, R² unabhängig voneinander ausgewählt aus einer Gruppe bestehend aus Resten von natürlichen oder unnatürlichen Aminosäuren wie z.B. aus: Glycin, Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Serin, Threonin, Cystein, Methionin, Phenylalanin, Tyrosin, Histidin, Tryptophan, Lysin, Ornithin; Asparaginsäure, Glutaminsäure, Asparagin, Glutamin, Arginin, Prolin, Hydroxyprolin, Sarcosin, Aminoisobuttersäure, Dehydroamino-säuren wie z.B. Dehydroalanin, Dehydro- α -aminobuttersäure, andere unnatürliche Aminosäuren wie Phenylglycin, 4-Nitrophenylalanin, 3-Nitrophenylalanin, 2-Nitrophenylalanin, 1-Naphthylalanin oder 2-Naphthylalanin, gegebenenfalls mit Schutzgruppen, stereochemisch einheitlich in der L- oder D-Form steht,
- E und Q miteinander über eine Alkylkette [(-CH₂)_n mit n = 0, 1, 2] verbunden sein können
- M für -CH₂-, -CO-, -SO₂-, -SO-, -CS- steht,
L für (CH₂)_p mit p = 0, 1, 2, -CHR-, -CRR'- steht,
U für -NH-, -NR- steht,
X für eine beliebige aus der Peptidchemie bekannte Schutzgruppe, H oder eine beliebige natürliche oder unnatürliche Aminosäure in geschützter oder ungeschützter Form steht und
Y für COOH, CSOH, CH₂OH, COOR" mit R" = beliebige Schutzgruppe aus der Peptidchemie, Carrier, Reporter-Ligand, löslichkeitsvermittelnde Gruppe steht,
- R und R' für H, OH, Alkyl, Aralkyl oder Aryl stehen.
6. Verbindungen der allgemeinen Formel (II) gemäß Anspruch 4, in der
- A für -CO-, -CHR-, -CRR'- steht,
B unabhängig voneinander gewählt wird aus einer Gruppe, bestehend aus: -H, -OH, (C₁-C₄)-Alkanoyl, DNA-Interkalatoren, aromatischen Resten, heterocyclischen Resten, natürlich vorkommenden Nukleobasen wie Thymin, Uracil, Cytosin, Adenin, Guanin, Hypoxanthin, Inosin sowie halogenierten Vorstufen dieser Nukleobasen sowie geschützte Derivate dieser Nukleobasen mit den in der Nukleotid- oder Peptidchemie üblichen Schutzgruppen,
- C für -CH-, -CR- steht, wobei C einheitlich S oder R konfiguriert sein kann,
D für -NH-, -CH₂-, -CHR-, -CRR'- steht,
E für -NR-, -NH-, -CHR-, -O- steht,
Q für (-CR¹R²)_m mit m = 0, 1, 2 und R¹, R² unabhängig voneinander ausgewählt aus einer Gruppe bestehend aus Resten von natürlichen oder unnatürlichen Aminosäuren wie z.B. aus: Glycin, Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Serin, Threonin, Cystein, Methionin, Phenylalanin,

Thyrosin, Histidin, Tryptophan, Lysin, Ornithin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Asparagin, Glutamin, Arginin, Prolin, Hydroxyprolin, Sarcosin, Aminoisobuttersäure, Dehydroaminoäuren wie z.B. Dehydroalanin, Dehydro- α -aminobuttersäure, andere unnatürliche Aminosäuren wie Phenylglycin, gegebenenfalls mit Schutzgruppen, stereochemisch einheitlich in der L-Form oder der D-Form steht,

- E und Q miteinander über eine Alkylkette [(-CH₂-)_n mit n = 0, 1, 2] verbunden sein können
 M für -CH₂-, -CO-, -CS- steht,
 L für (CH₂)_p mit p = 0, 1, 2, -CHR-, -CRR'- steht,
 U für -NH-, -NR- steht,
 X für eine beliebige aus der Peptidchemie bekannte Schutzgruppe, H oder eine beliebige natürliche oder unnatürliche Aminosäure in geschützter oder ungeschützter Form steht
 Y für COOH, CSOH, CH₂OH, COOR'' mit R'' = beliebige Schutzgruppe aus der Peptidchemie, Carrier, Reporter-Ligand, löslichkeitsvermittelnde Gruppe steht.
 R und R' für H, OH, Alkyl, Aralkyl oder Aryl stehen.

15 7. Verbindungen der allgemeinen Formel (III)



- in der
- 30 A für -CO-, -CHR-, -CRR'- steht,
 B unabhängig voneinander gewählt wird aus einer Gruppe, bestehend aus: -H, -OH, (C₁-C₄)-Alkanoyl, DNA-Interkalatoren, aromatischen Resten, heterocyclischen Resten, natürlich vorkommenden Nukleobasen wie Thymin, Uracil, Cytosin, Adenin, Guanin, Hypoxanthin, Inosin oder durch chemische Modifikation von diesen abgeleiteten Derivaten, sowie halogenierten Vorstufen dieser Nukleobasen sowie geschützte Derivate dieser Nukleobasen mit den in der Nukleotid- oder Peptidchemie üblichen Schutzgruppen,
 C für -CH-, -CR- steht, wobei C einheitlich S oder R konfiguriert sein kann,
 D für -NH-, CH₂-, -CHR-, -CRR'- steht,
 E für -NR-, -CHR-, -CRR'-, -O-, -S- steht,
 Q für (-CR¹R²)_m mit m = 0, 1, 2 und R¹, R² unabhängig voneinander ausgewählt aus einer Gruppe bestehend aus Resten von natürlichen oder unnatürlichen Aminosäuren wie z.B. aus: Glycin, Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Serin, Threonin, Cystein, Methionin, Phenylalanin, Tyrosin, Histidin, Tryptophan, Lysin, Ornithin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Asparagin, Glutamin, Arginin, Prolin, Hydroxyprolin, Sarcosin, Aminoisobuttersäure, Dehydroaminoäuren wie z.B. Dehydroalanin, Dehydro- α -aminobuttersäure, andere unnatürliche Aminosäuren wie Phenylglycin, 4-Nitrophenylalanin, 3-Nitrophenylalanin, 2-Nitrophenylalanin, 2-, 3- oder 4-Aminophenylalanin, 3,4-Dichlorphenylalanin, 4-Jodphenylalanin, 4-Methoxyphenylalanin, 1-Triazolylalanin, 2-Pyridylalanin, 3-Pyridylalanin, 4-Pyridylalanin, 1-Naphthylalanin oder 2-Naphthylalanin, gegebenenfalls mit Schutzgruppen, stereochemisch einheitlich in der L-Form oder der D-Form steht;
- 50 E und Q miteinander über eine Alkylkette [(-CH₂-)_n mit n = 0, 1, 2] verbunden sein können
 M für -CH₂-, -CO-, -SO₂-, -SO-, -CS- steht,
 U für -NH-, -NR- steht,
 X für eine beliebige aus der Peptidchemie bekannte Schutzgruppe, H oder eine beliebige natürliche oder unnatürliche Aminosäure in geschützter oder ungeschützter Form steht,
 Y für COOH, CSOH, CH₂OH, COOR'' mit R'' = beliebige Schutzgruppe aus der Peptidchemie, Carrier, Reporter-Ligand, löslichkeitsvermittelnde Gruppe steht,
 W für ein chirales C-Atom steht, welches einheitlich S oder R konfiguriert sein kann,

R und R' für H, OH, Alkyl, Aralkyl oder Aryl stehen.

8. Verbindungen der Formel (III) gemäß Anspruch 7, in der

- A für -CO-, -CHR-, -CRR'- steht,
- B unabhängig voneinander gewählt wird aus einer Gruppe, bestehend aus: -H, -OH, (C_1-C_4)-Alkanoyl, DNA-Interkalatoren, aromatischen Resten, heterocyclischen Resten, natürlich vorkommenden Nukleobasen wie Thymin, Uracil, Cytosin, Adenin, Guanin, Hypoxanthin, Inosin sowie halogenierten Vorstufen dieser Nukleobasen, sowie geschützte Derivate dieser Nukleobasen mit den in der Nukleotid- oder Peptidchemie üblichen Schutzgruppen,
- C für -CH-, -CR- steht, wobei C einheitlich S oder R konfiguriert sein kann,
- D für -NH-, -CH₂-, -CHR-, -CRR'- steht,
- E für -NR-, -NH-, -CHR-, -CRR'-, -O- steht,
- Q für $(-CR^1R^2)^m$ mit m = 0, 1, 2 und R¹, R² unabhängig voneinander ausgewählt aus einer Gruppe bestehend aus Resten von natürlichen oder unnatürlichen Aminosäuren wie z.B. aus: Glycin, Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Serin, Threonin, Cystein, Methionin; Phenylalanin, Thyrosin, Histidin, Tryptophan, Lysin, Ornithin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Asparagin, Glutamin, Arginin, Prolin, Hydroxyprolin, Sarcosin, Aminoisobuttersäure, Dehydroaminoäuren wie z.B. Dehydroalanin, Dehydro- α -aminobuttersäure, andere unnatürliche Aminosäuren wie Phenylglycin, 4-Nitrophenylalanin, 3-Nitrophenylalanin, 2-Nitrophenylalanin, 1-Naphthylalanin oder 2-Naphthylalanin, gegebenenfalls mit Schutzgruppen, stereochemisch einheitlich in der L-Form oder der D-Form steht,
- E und Q miteinander über eine Alkylkette $[(-CH_2)_n$ mit n = 0, 1, 2] verbunden sein können
- M für -CH₂-, -CO-, -SO₂-, -SO-, -CS- steht,
- U für -NH-, -NR- steht,
- X für eine beliebige aus der Peptidchemie bekannte Schutzgruppe, H oder eine beliebige natürliche oder unnatürliche Aminosäure in geschützter oder ungeschützter Form steht,
- Y für COOH, CSOH, CH₂OH, COOR" mit R" = beliebige Schutzgruppe aus der Peptidchemie, Carrier, Reporter-Ligand, löslichkeitsvermittelnde Gruppe steht,
- W für ein chirales C-Atom steht, welches einheitlich S oder R konfiguriert sein kann,

R und R' für H, OH, Alkyl, Aralkyl oder Aryl stehen.

9. Verbindungen der Formel (III) gemäß Anspruch 7, in der

- A für -CO-, -CHR-, -CRR'- steht
- B unabhängig voneinander gewählt wird aus einer Gruppe, bestehend aus: -H, -OH, (C_1-C_4)-Alkanoyl, DNA-Interkalatoren, aromatischen Resten, heterocyclischen Resten, natürlich vorkommenden Nukleobasen wie Thymin, Uracil, Cytosin, Adenin, Guanin, Hypoxanthin, Inosin sowie halogenierten Vorstufen dieser Nukleobasen sowie geschützte Derivate dieser Nukleobasen mit den in der Nukleotid- oder Peptidchemie üblichen Schutzgruppen,
- C für -CH-, -CR- steht, wobei C einheitlich S oder R konfiguriert sein kann,
- D für -NH-, -CH₂-, -CHR-, -CRR'- steht,
- E für -NR-, -NH-, -CHR-, -O- steht,
- Q für $(-CR^1R^2)^m$ mit m = 0, 1, 2 und R¹, R² unabhängig voneinander ausgewählt aus einer Gruppe bestehend aus Resten von natürlichen oder unnatürlichen Aminosäuren wie z.B. aus: Glycin, Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Serin, Threonin, Cystein, Methionin, Phenylalanin, Thyrosin, Histidin, Tryptophan, Lysin, Ornithin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Asparagin, Glutamin, Arginin, Prolin, Hydroxyprolin, Sarcosin, Aminoisobuttersäure, Dehydroaminoäuren wie z.B. Dehydroalanin, Dehydro- α -aminobuttersäure, andere unnatürliche Aminosäuren wie Phenylglycin, gegebenenfalls mit Schutzgruppen, stereochemisch einheitlich in der L-Form oder der D-Form steht,
- E und Q miteinander über eine Alkylkette $[(-CH_2)_n$ mit n = 0, 1, 2] verbunden sein können
- M für -CH₂-, -CO-, -CS- steht,
- U für -NH-, -NR- steht,
- X für eine beliebige aus der Peptidchemie bekannte Schutzgruppe, H oder eine beliebige natürliche oder unnatürliche Aminosäure in geschützter oder ungeschützter Form steht,
- Y für COOH, CSOH, CH₂OH, COOR" mit R" = beliebige Schutzgruppe aus der Peptidchemie, Carrier, Reporter-Ligand, löslichkeitsvermittelnde Gruppe steht,
- W für ein chirales C-Atom steht, welches einheitlich S oder R konfiguriert sein kann,

R und R' für H, OH, Alkyl, Aralkyl oder Aryl stehen.

EP 0 646 596 A1

10. Arzneimittel enthaltend eine oder mehrere Verbindungen aus den Ansprüchen 1 bis 9.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung

EP 94113573.3

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	
A	EP - A - 0 300 796 (SYNTEX (U.S.A.) INC) * Ansprüche 1-3 *	1-10	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl. 6)
A	CHEMICAL ABSTRACTS, Band 113, Nr. 21, 19. November 1990, Columbus, Ohio, USA P. WESTERMANN et al. "Preparation of oligodoxy- ribonucleotide-based affinity carriers" Seite 776, Nr. 191 856t; & DD-A-273 444	1-10	C 07 K 5/00 A 61 K 38/10
A	CHEMICAL ABSTRACTS, Band 94, Nr. 5, 2. Februar 1981. Columbus, Ohio, USA S.A. STREL'TSOV et al. "Specific interaction between oligovaline and nucleic acids Seite 185, Nr. 26 354j; & Biofizika 11980, 25(5). 929-41	1-10	RECHERCHIERTE SACHGEBiete (Int. Cl. 6)
	-----		C 07 K 5/00 A 61 K 38/00
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt.			
Recherchenort	Abschlußdatum der Recherche	Prüfer	
WIEN	11-11-1994	BRUS	
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTEN		E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument	
X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur T : der Erlösung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze		& : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	